

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Viktorie Laštůvková

Senescence buněk se zaměřením na telomerázovou teorii
Cell senescence with a focus on telomerase theory

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D

Praha, 2020

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. za její profesionální vedení práce, vstřícný přístup, užitečné rady, ochotu a především čas, který mi při psaní této bakalářské práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala rodině, příteli a přátelům za podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1.6.2020

Viktorie Laštůvková

Abstrakt

Buněčná senescence je ireversibilní stav, při kterém dochází k ukončení buněčného cyklu. Buňka zůstává metabolicky aktivní, ale její fyziologické funkce jsou omezeny. Zastavení buněčného cyklu je odpovědí na činnost řady faktorů, z nichž většina různým způsobem zasahuje sekundární strukturu DNA a způsobuje její poškození. Dalšími iniciátory vstupu buňky do senescentního stavu bývají onkogeny a chemoterapeutika. Jedním z nejlépe prostudovaných faktorů, který je zároveň svým způsobem „nejspravedlivější“, je zkracování telomer. Telomery jsou nekódující oblasti DNA na chromozomových koncích, které se s každým dělením buňky o kousek zkrátí. Pokud buňka nemá mechanismy vyrovnávající tuto ztrátu, dojde po určité době k dosažení Hayflickova limitu. Obecně se dá senescence považovat za ochranný mechanismus zabráňující vzniku patologií na základě poškození DNA. Přítomnost senescentních buněk v tkáních je však často ambivalentní, s věkem se hromadí a mohou být příčinou mnoha degenerativních onemocnění. Senescentní fenotyp zahrnuje široké spektrum projevů jako například změny velikosti a tvaru buňky, zvýšenou granularitu či pozměněnou škálu exprimovaných genů. Výrazným jevem senescentních buněk je sekrece biologicky aktivních faktorů přispívajících k fyziologickým či patologickým změnám v organismu.

Klíčová slova:

buněčná senescence, stárnutí, telomery, Telomerová teorie, Hayflickův limit, telomeráza

Abstract

Cell senescence is an irreversible state in which the cell cycle ends. The cell remains metabolically active, but its physiological functions are limited. Cell cycle arrest is a response to the action of a number of factors, most of which affect the secondary structure of DNA in various ways and cause damage to it. Other initiators of cell entry into the senescent state are oncogenes and chemotherapeutics. One of the best studied factors, which is also in a way the "fairest", is the shortening of the telomere. Telomeres are non-coding regions of DNA at the chromosome ends that shorten slightly with each division of the cell. If the cell does not have mechanisms to compensate for this loss, the Hayflick limit is reached after a certain time. In general, senescence can be considered as a protective mechanism to prevent DNA damage pathologies. However, the presence of senescent cells in tissues is often ambivalent, accumulates with age, and can cause many degenerative diseases. The senescent phenotype includes a wide range of signs such as changes in cell size and shape, increased granularity, or altered range of expressed genes. A significant phenomenon of senescent cells is the secretion of biologically active factors contributing to physiological or pathological changes in the organism.

Key words:

Cellular senescence, ageing, telomeres, telomere theory, Hayflick limit, telomerase

Seznam použitých zkratek

53BP1	<i>Tumor supressor p53-binding protein 1</i>	Tumor supresorový p53 vazebný protein 1
ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i>	Alternativní prodlužování telomer
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated, ATM serine/threonine kinase</i>	ATM serin/threoninová kináza
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Adenosin trifosfát
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, Serine/threonine-protein kinase ATR</i>	ATR serin/threoninová kináza
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>	Protein interagující s ATR
BRCA1, BRCA2	<i>Breast cancer susceptibility protein type 1, 2</i>	
C/EBPβ	<i>CCAAT enhancer binding protein beta</i>	
CDC25	<i>Cell division cycle 25 phosphatase</i>	
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	Cyklin-dependentní kináza
CST	<i>Multiprotein complex that consists of the proteins CTC1, STN1, and TEN1</i>	Multiproteinový komplex proteinů CTC1, STN1 a TEN1
DDR	<i>DNA-damage response</i>	Odpověď na poškození DNA
DHFR	<i>Dihydrofolate reductase</i>	Dihydrofolát reduktáza
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoxyribonukleotidová kyselina
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>	Katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy
DSB	<i>Double strand break</i>	Dvouvláknový zlom
FOXO	<i>Subgroup of the Forkhead family of transcription factors</i>	Podskupina rodiny transkripčních faktorů Forkhead
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA Damage proteins</i>	Stresové senzory
GH	<i>Growth hormone</i>	Růstový hormon
GRO-α	<i>Chemokine, oncogene</i>	Chemokin, onkogen
H/ACA		Rodina snoRNA zprostředkovávající metylaci nukleotidu
HDAi	<i>Histone deacetylase inhibition</i>	Inhibice histonových deacetyláz
HeLa	<i>Abbrevitation of the name Henrietta Lacks</i>	Zkratka jména Henrietta Lacks
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>	
hTR,	<i>Human Telomerase RNA component</i>	Lidská forma RNA telomerázového komponentu
CHK1, CHK2	<i>Checkpoint kinase 1, 2</i>	Serin/threonin specifická protein kináza
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	Inzulinový růstový faktor 1
IL-1α	<i>Interleukin 1 alpha, Hematopoietin 1</i>	

IL-6, IL-7, IL-8	<i>Interleukin 6, 7, 8</i>	
MDC1/NFBD1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1, Nuclear Factor with BRCT Domain 1</i>	
MMP-1	<i>Matrix metalloproteinase-1, fibroblast collagenase</i>	Matrixová metaloproteáza 1. fibroblastová kolagenáza
MMP-10	<i>Matrix metalloproteinase-10, Stromelysin-2</i>	Matrixová metaloproteáza 10
MMP-3	<i>Matrix metalloproteinase-3, Stromelysin-1</i>	Matrixová metaloproteáza 3
MRE-11	<i>Meiotic recombination 11-like protein</i>	
MRN	<i>Complex of proteins MRE11, RAD50, NBS1</i>	Komplex proteinů MRE11, RAD50, NBS1
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i>	Mitochondriální DNA
Myb	<i>Avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i>	
NBS-1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1-like protein</i>	
NER/NR1H2	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2</i>	
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	Nehomologní párování konců
NHP2	<i>Nucleolar protein family A, member 2 (H/ACA small nucleolar RNPs)</i>	
NIA	<i>National Institute on Aging</i>	Národní institut pro stárnutí
PαP		Polymeráza a α-primáza
p16/CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>	
p21/ CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>	
p53	<i>Tumor protein p53</i>	
PCD	<i>Programmed cell death</i>	Programovaná buněčná smrt
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases</i>	fosfatidilinositol-3-kinázové kinázy
PIN2/TERF1/ TRF1	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	
Polα	<i>DNA polymerase alpha</i>	DNA polymeráza alfa
POT1	<i>protection of telomeres 1</i>	
RAD50	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>	
Rad51	<i>BRCA1/BRCA2-containing complex</i>	
Rad1	<i>RAD1 checkpoint DNA exonuclease</i>	
Rad9	<i>RAD9 checkpoint clamp component A</i>	
Rap1/ TERF2IP	<i>TERF2 interacting protein</i>	
rDNA	<i>Ribosomal DNA</i>	Ribosomální DNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ribonukleotidová kyselina
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i>	Ribonukleoprotein
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktivní kyslíkové radikály
RPA	<i>Replication protein A</i>	Replikační protein A

SA-β-gal	<i>Senescence-associated beta-galactosidase</i>	Beta galaktosidáza asociovaná se senescencí
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>	Heterochromatinová ložiska asociovaná se senescencí
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>	Sekreční fenotyp asociovaný se senescencí
scaRNA	<i>Small Cajal body-specific RNAs</i>	
SDB	<i>Sodium dibutyrate</i>	Dibutyrát sodný
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	
SMC1	<i>Structural maintenance of chromosomes 1A</i>	
SNM1/Pso2/	<i>DNA cross-link repair 1A</i>	
DCLRE1A		
snoRNA	<i>Type of small nucleolar RNAs</i>	
snRNA	<i>Small nucleolar RNAs</i>	
T-SCE	<i>Telomere sister chromatid exchange</i>	Výměna telomer sesterských chromatid
TERRA	<i>Telomeric Repeat-containing RNA</i>	RNA molekuly obsahující telomerické repetice
TIN2	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	
TPP1	<i>tripeptidyl peptidase 1</i>	
TR, TERC, TER	<i>Telomerase RNA component</i>	Telomerázový RNA komponent
TRF1,	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	
TRF2	<i>TATA-box binding protein like 1</i>	
TSA	<i>Trichostatin A</i>	
UCSF	<i>University of California, San Francisco</i>	Kalifornská univerzita v San Francisku
USA	<i>United States of America</i>	
γH2AX	<i>Phosphorylated form of H2A histone family member X</i>	Fosforylovaný histon H2AX

Obsah

Úvod	1
1 Počátky	2
1.1 <i>Předchůdci Hayflicka</i>	2
1.2 <i>Leonard Hayflick</i>	2
1.3 <i>Objevení replikačního problému konců telomer</i>	3
2 Senescence	3
2.1 <i>Morfologické znaky senescentní buňky</i>	3
2.1.1 SA-4	
2.1.2 Histon γ -H2AX	5
2.1.3 SAHF	5
2.1.4 SASP	6
2.2 <i>Faktory vstupu buňky do senescence</i>	6
2.2.1 Nahromadění poškození DNA	6
2.2.2 Chronický zánět	7
2.2.3 Porucha stability a funkce proteomu	7
2.2.4 Epigenetické faktory	7
2.2.5 Eroze telomer	7
2.2.6 Vyčerpání kmenových buněk	8
2.2.7 Inzulinová signální dráha a deregulované snímání živin	8
2.2.8 Mitochondriální dysfunkce	8
2.3 <i>Přechod do senescentního stádia</i>	9
2.4 <i>Odpověď na poškození DNA</i>	10
2.4.1 Signalizační kinázy	10
2.4.2 Signalizační odpověď na poškození DNA	11
3 Telomerová teorie	13
3.1 <i>Objev telomer</i>	13
3.2 <i>Struktura</i>	14
3.3 <i>Ochrana telomer</i>	15
3.3.1 T-smyčka	15
3.3.2 Shelterin komplex	15

3.3.3	DNA-PKcs a Ku 70/80	16
3.3.4	RNA molekuly telomerických repetit	16
3.4	<i>Replikační problém telomer</i>	17
3.5	<i>Telomeráza</i>	18
3.5.1	Mechanismus účinku telomerázy	19
3.5.2	Regulační mechanismy enzymu telomerázy	20
3.6	<i>Alternativní prodlužování telomer</i>	23
4	Telomery v gametách	24
4.1	<i>Stárnutí a telomery oocytů</i>	24
4.2	<i>Telomery spermií</i>	25
	Závěr	26
	Seznam literatury	28

Úvod

Stárnutí je již dlouhou dobu předním tématem výzkumu mnoha významných laboratoří po celém světě. Snad díky tlaku společnosti, kde se s pojmy nesmrtelnost, elixír života či věčné mládí setkáváme již několik stovek let. Chceme-li se kvalitativně zabývat stárnutím organismu, je nutné se prvořadě zaměřit na jednotlivé buňky či buněčné kolonie. Přesně odtud totiž pochází prvotní signál vedoucí k programované buněčné smrti (PCD) či zastavení buněčného cyklu.

Zastavením buněčného cyklu nastává stav nazývaný se buněčná senescence. Senescentní buňka se již dále nedělí, ale zůstává metabolicky aktivní. Na první pohled se od normálních zdravých buněk morfologicky liší, bývá větší, než je její standard a tvar je často také atypický. Mohou se v ní nacházet objemné molekuly a zvětšené jádro se specificky pozměněnými heterochromatinovými ložisky (SAHF), které pravděpodobně přispívají ke změnám genové exprese a k stálosti fenotypu senescentní buňky (Narita et al., 2003). V senescentní buňce se odehrává mnoho procesů, při kterých je vylučována řada mediátorových molekul. Tento sekreční komplex je uváděn jako sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SASP) a je jedním z hlavních znaků senescentních buněk.

Původně se za jediný stimul vedoucí k buněčné senescenci považovalo dosažení Hayflickova replikačního limitu (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961), avšak díky modernějším technikám se později přišlo na další faktory zastavující replikační potenciál buňky. Těmi jsou například onkogeny nebo různé jiné intracelulární či extracelulární stresové faktory.

Oba zmíněné procesy (PCD a senescence) většinou evokují něco negativního\patologického, nicméně jsou to důležité součásti normálního vývoje buňky či organismu jako celku. Zasahují do reprodukčních mechanismů, ovlivňují kvalitu zárodečných buněk a hrají také významnou roli při udržování homeostázy. Paradoxně se se senescencí a s pochody, které zastřešuje souhrnný pojem PCD, setkáváme nejčastěji u dlouho žijících organismů, člověka nevyjímaje.

Cílem mé bakalářské práce je zařadit do historického kontextu hlavní milníky ve výzkumu buněčného stárnutí, shrnout dosavadní obecné poznatky o buněčné senescenci na molekulární úrovni, popsat základní charakteristiky senescentní buňky a v souvislosti s faktory ovlivňujícími vstup do senescentního stádia se zaměřit na Telomerázovou teorii. Chtěla bych také objasnit mechanismus zkracování telomer v klasických somatických buňkách, regulaci tohoto procesu a nastínit jakým způsobem stárnutí ovlivňuje buňky zárodečné.

1 Počátky

Stárnutí je v dnešní době na vědecké půdě velmi probíraným a zkoumaným tématem. Počátky zájmu o toto téma leckdo přiřazuje době, kdy L. Hayflick přišel s Telomerázovou teorií. Pokud se chceme podívat na opravdový počátek myšlenky, že buněčné dělení není neomezené, musíme jít ještě mnohem dál do minulosti, konkrétně na konec 19. století.

1.1 Předchůdci Hayflicka

Prvenství se v tomto ohledu přiděluje německému biologovi A. Weissmanovi, který v r. 1881 přišel s tehdy ještě kontroverzní myšlenkou, že *„dochází ke smrti, protože opotřebovaná tkáň se nemůže navždy obnovit sama a protože kapacita pro zvýšení pomocí buněčného dělení není trvalá, ale konečná“* (Weismann, 1892). Jeho výrok ovšem nezískal mnoho pozornosti a byl na dlouhou dobu zapomenut. O 40 let později francouzský lékař a biolog Alexis Carrel naopak prohlásil, že se mu v laboratorních podmínkách fibroblasty z kuřecího srdce obnovovaly po dobu 34 let (Carrel and Ebeling, 1921). Stál tedy za teorií, že buňky jsou schopny proliferovat nekonečně a že výsledky A. Weismannových pokusů byly vyvozeny ze špatně nastavených kultivačních podmínek. Teorie byla veřejně přijata, nicméně nebyla podpořena jinými vědci a to nejspíš kvůli chybě, kterou při experimentu A. Carrel udělal. Kuřecí fibroblasty v kultuře sice proliferovaly neomezeně, ale mohlo to být způsobeno tím, že byly kultivovány s výtažkem získaným z kuřecí embryonální tkáně. Vzhledem k tomu, že se médium denně měnilo, byl tímto zajištěn přísun nových buněk do kultury (*Shay and Wright, 2000). Spekulovalo se i o tom, že A. Carrel o tomto problému věděl, nicméně to nebylo nikdy potvrzeno.

Carrelova teorie byla i přes své kontroverze považovaná za správnou až do doby, kdy se stejným problémem začali zabývat i další vědci, zejména pak Dr. H. Earle Swim a Dr. Robert F. Parker (Swim and Parker, 1957) a následně profesor Leonard Hayflick (Hayflick, 1965; 1979).

1.2 Leonard Hayflick

Prof. Leonard Hayflick (*1928) je známý výzkumy v oblastech buněčné biologie a mykoplazmologie. Také se podílel na vývoji virových vakcín. V současné době je i přes svůj vysoký věk profesorem anatomie na Lékařské fakultě UCSF. Dříve působil jako profesor lékařské mikrobiologie na Lékařské fakultě Stanfordské univerzity v USA. Je také bývalým prezidentem Americké gerontologické společnosti a byl zakládajícím členem rady Národního institutu pro stárnutí (NIA).

V roce 1958, krátce po dokončení postgraduálního studia na Pensylvánské univerzitě, začal poprvé řešit omezení buněčného dělení v rámci svého výzkumu virové etologie rakoviny. Přelom nastal v r. 1961, kdy prof. L. Hayflick a Paul Sidney Moorhead při svém výzkumu kultivovaných lidských fibroblastů pozorovali jev, který vyvracel A. Carrelovo tvrzení o schopnosti nekonečného obnovování buněk kultivovaných *in vitro* (Hayflick and Moorhead, 1961). Buněčný cyklus od prvního dělení rozdělili do tří fází. Po dosažení limitu dělení, který se zpravidla pohyboval kolem 50-70 dělení za cyklus jednoho lidského fibroblastu, nastala replikační senescence. Buňky zůstaly živé, ale dále se už nedělily (Hayflick, 1965). Tento limit buněčného dělení byl pojmenován jako Hayflickův limit či také jako limit životnosti (z angl. lifespan limit). Tímto objevem započalo zkoumání buněčné senescence.

1.3 Objevení replikačního problému konců telomer

Ruský biolog A. Olovnikov přišel zanedlouho po Hayflickově objevu s myšlenkou, že limit dělení je způsoben problémem s replikací a erozí telomer (Olovnikov, 1973; 1996). Později v r. 1990 byla tato teorie experimentálně doložena (Harley et al., 1990) a tak jsme se dostali zase o kousek blíže k pochopení procesů senescence (*Bielak-Zmijewska et al., 2018).

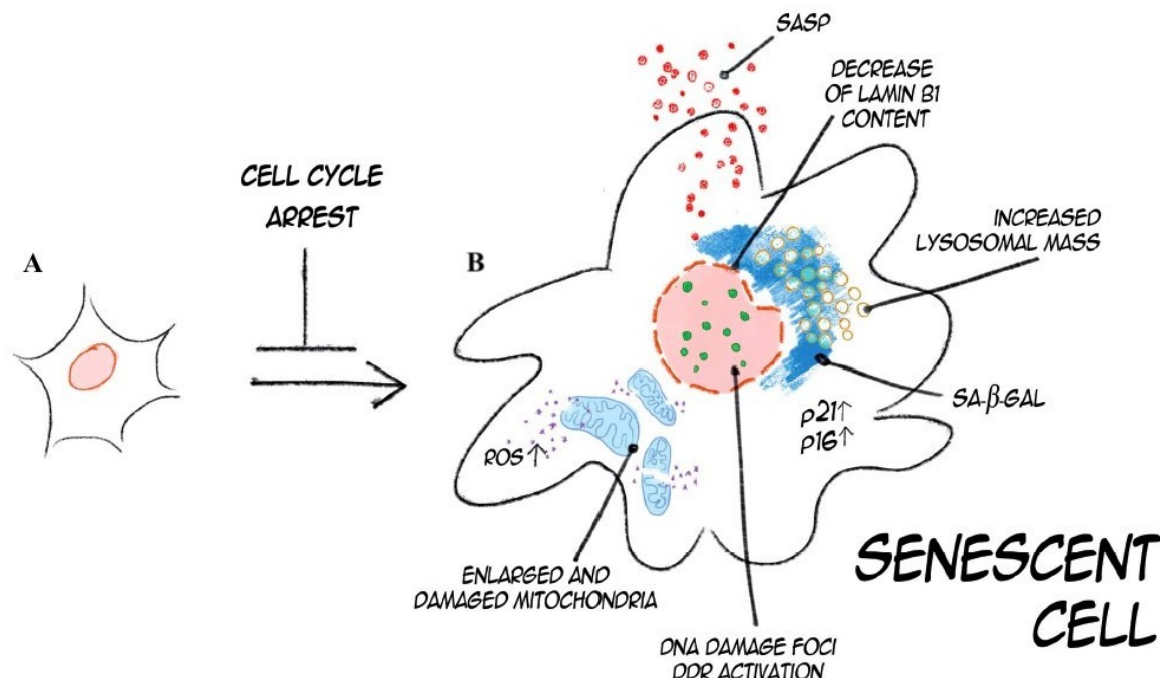
2 Senescence

Nejstručněji se dá senescentní buňka popsat jako žijící jednotka neschopná další reprodukce (dělení). Je to ireversibilně změněný buněčný stav, který nastoupí jako reakce na persistentní poškození DNA buňky (Biran et al., 2017). Důvodem přechodu buňky do senescentní fáze zdaleka není pouze dosažení Hayflickova limitu. Příčin je mnoho a s jejich diverzitou narůstají i způsoby, jakými se buňka do tohoto reprodukčně neaktivního stadia dostane. Senescentní fenotyp většiny buněk je však zpravidla velmi podobný, proto je následující podkapitola věnována právě jemu.

2.1 Morfologické znaky senescentní buňky

Vedle neschopnosti dělit se, zůstávají senescentní buňky živé a metabolicky aktivní. Prvním viditelným rozdílem je nepravidelný tvar, pozměněná velikost buněk a také jejich zvýšená granularita. Mitochondrie u těchto buněk jsou velké, nefunkční a navíc produkují velké množství reaktivních oxidových radikálů (ROS). Jsou taktéž přítomny chromatinové fragmenty vzniklé v důsledku ztráty laminu B1. V závislosti na tom pak dochází k rozpadu jádra. V cytoplazmě se tedy vyskytují heterochromatinová ložiska (SAHF) spojovaná s buněčným stárnutím. Ložiska poškozené DNA jsou detekována jako fosforylované histony H2AX (γ -H2AX). V neposlední řadě je také zvýšená aktivita lysosomální β -galaktosidázy (SA- β -gal) asociované se senescencí (*Sikora et al., 2018) (viz. Obr. 1).

Velmi důležitým znakem senescentního fenotypu je jeho stabilita. Na rozdíl od buněk v klidovém stadiu, senescentní buňky nereagují na mitogeny jako např. růstové faktory či sérum. Není tedy jasný molekulární mechanismus, který tyto buňky vede k této inertnosti (*Narita, 2007).



Obr. 1: Přejít buňky do senescentního stádia.

A. Normální zdravá dělící se buňka. **B.** Buňka v senescentním stadiu s vyznačenými projevy senescence (SASP, pokles laminu B1, zvětšení objemu lysozomální hmoty, SA- β -gal, aktivace odpovědi na poškození DNA, výskyt SAHF, zvětšené mitochondrie produkující ROS) (upraveno a převzato ze *Sikora et al., 2018).

2.1.1 SA- β -Galaktosidáza

Zvýšená hladina lysozomální β -galaktosidázy asociované se senescencí (SA- β -gal) je považovaná za znak buněčného stárnutí. V posledních letech se ukazuje, že její důležitost na poli specifických ukazatelů buněčné senescence není tak markantní, jak se předpokládalo. Hladina SA- β -gal se při procesech stárnutí nezvyšuje ve všech typech buněk a u všech organismů. U člověka však může být stále užitečnou při detekci senescentních buněk (Dimri et al., 1995; Gary and Kindell, 2005; Lawless et al., 2010; Severino et al., 2000).

Při experimentálním zjišťování hladin SA- β -gal se používá 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktosidáza (X-gal), který je vizuálně patrný jako modré zbarvení (Pati et al., 2014).

2.1.2 Histon γ -H2AX

Druhý, nejčastěji diskutovaný znak buněčného stárnutí byl objeven na základě rozdílů při migraci izoform H2A histonů na SDS gelu (West and Bonner, 1980). Strukturně se od H2A histonu liší fosforylací γ -serinu na C-terminálním konci. K fosforylaci dochází hned po identifikaci dvouřetězcového zlomu na DNA (*Redon et al., 2002).

Studie ukazují korelaci mezi výskytem γ -H2AX a zkracováním telomer při stárnutí buněk. Ložiska fosforylovaného histonu se častěji objevují v místech, kde se vyskytují faktory pro opravu poškozené DNA (např. *Rad51*, *BRCA1*, *Mre11*, *Rad50*) (Furuta et al., 2003). Tady vzniká problém, protože γ -H2AX se nevyskytuje pouze u DNA, kde je poškození způsobené zkracováním telomer, ale i u zlomů DNA, které zapříčinilo např. ionizační záření (Rogakou et al., 1998). Tím pádem není histon γ -H2AX příliš specifickým znakem a nemůže být jediným důkazem při identifikaci senescentních buněk.

2.1.3 SAHF

Všeobecně se heterochromatinová ložiska asociovaná se senescencí (SAHF) nedá úplně považovat za univerzální znak senescentních buněk. Nicméně několik studií dokázalo, že výskyt heterochromatinových ložisek je v některých případech se senescencí provázaný (Kennedy et al., 2010; Kosar et al., 2011; Narita et al., 2003).

Je známo, že aktivita chromatinu závisí na modifikacích histonů (acetylace, metylace). Buď je chromatin aktivní a označuje se jako euchromatin, nebo je neaktivní a označuje se jako heterochromatin.

Heterochromatin se dělí na konstitutivní a fakultativní. Konstitutivní heterochromatin by se dal popsat jako transkripčně umlčená ložiska DNA charakterizovaná histonovou hypoacetylací a lysinovou metylací histonu H3. Je to trvalá forma DNA a vyskytuje se (u člověka) hlavně v oblasti centromer některých chromozomů. Fakultativní heterochromatin je indukovaný a nejdůležitější roli hraje na chromozomu X, kde umlčuje geny při embryogenezi. SAHF je tvořen tímto typem heterochromatinu a je indukovaný v senescentních buňkách (Zhang et al., 2005).

Předpokládá se, že hraje roli v potlačování exprese genů, čímž přispívá k procesu stárnutí. Příkladem je umlčování exprese genu *E2F*, který za normálních okolností podporuje proliferaci cílových genů, kterými jsou například *cyklin A*, *DHFR*, *Mcm3* (Zhang et al., 2007).

2.1.3.1 HDAi

Inhibice histonových deacetyláz (HDAi) obnovuje funkci chromatinu a z neaktivního heterochromatinu se pak stává aktivní euchromatin. Tento proces u buněk překvapivě způsobuje fenotyp podobný replikativní senescenci, avšak bez spojitosti s délkou telomer. Na svědomí to mají inhibitory histon deacetylázy dibutyryát sodný (SDB) a trichostatin A (TSA) (Munro et al., 2004; Ogryzko et al., 1996).

Mechanismus tohoto procesu je málo prozkoumaný a má odlišný průběh u různých organismů i typů buněk. V lidských fibroblastech indukuje expresi inhibitorů buněčného cyklu *p16* a *p21*, naproti tomu v myších fibroblastech hraje důležitější roli v tomto typu stárnutí *p53* (Munro et al., 2004). Také nejspíš způsobuje aktivaci ATM kinázy, čímž spouští kaskádu, vedoucí k přechodu buňky do senescentního stavu (Bakkenist and Kastan, 2003).

2.1.4 SASP

Jeden z nejdůležitějších znaků senescentní buňky je sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SASP). Jedná se o komplex chemokinů (GRO- α , MMC-1, IL-8), cytokinů (IL-1 α , IL-6, IL-7), proteáz (metaloproteázy – MMP1, 3, 10), mezibuněčné hmoty a remodelujících proteinů mezibuněčné hmoty (Acosta et al., 2013; *Coppé et al., 2010; *Freund et al., 2010). Zahrnuje autokrinní i parakrinní signalizaci, má protumorigenní a tumor-supresorovou funkci a také důležité protizánětlivé a prozánětlivé účinky. Svými projevy odráží roli senescentních buněk v patofyziologii stárnutí a v poruchách souvisejících s věkem (Coppé et al., 2008).

SASP jako široce rozsáhlý komplex s mnoha částmi zahrnuje ještě více složitý regulační systém, který dodnes není zcela prozkoumán. Regulace probíhá na několika úrovních, z nichž hlavními jsou regulace na transkripční úrovni, regulace související s DDR (Rodier et al., 2009), IL-1 α regulace (Orjalo et al., 2009) a dráhy spojené s mikroRNA (Bhaukik et al., 2009; Taganov et al., 2006).

Stimulátory, které vyvolávají buněčné stárnutí, svými účinky vytvářejí podmínky, při kterých dochází k poškození DNA. V závislosti na tom pak dochází různými způsoby k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a C/EBP β . Hrají také roli ve většině regulačních drah a jsou zodpovědné za transkripci mnoha SASP faktorů (Acosta et al., 2008; Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008).

2.2 Faktory vstupu buňky do senescence

Je hned několik důvodů, proč se normální zdravá buňka stane buňkou senescentní. Většina uvedených faktorů je individuální a jejich působení je ovlivněno typem, stavem nebo stářím buňky či organismu

jako celku. Účinky se mohou na sebe vázat, násobit se nebo se vzájemně potlačovat. To, co u jedné buňky způsobí fatální změny, jinou nemusí vůbec ovlivnit. Je obecně známým faktem, že v biologii známe jen velmi málo procesů, které mají jasně daná pravidla a jsou neměnné v závislosti na prostředí. Faktory ovlivňující přechod buněk do senescence k nim bezpochyby nepatří.

2.2.1 Nahromadění poškození DNA

Na problémy spojené s hromaděním lézí v genomu buněk se přišlo už kolem poloviny 20. století (Szilard, 1959). Vzhledem k množství exogenních (chemické, biologické, atd.) a endogenních (spontánní hydrolytické reakce, replikační chyby, atd.) stresorů působících na buňku, je téměř nemožné předejít poškození DNA. Široký je i repertoár typů poškození, avšak díky evolučním pochodům si buňka vytvořila účinný opravný mechanismus, který eliminuje většinu poškozených oblastí.

2.2.2 Chronický zánět

Výzkum chronického zánětu dokázal, že senescence není výhradně buněčným problémem, ale že na úrovni mezibuněčné komunikace zasahuje i organismus jako celek. Bylo taktéž dokázáno, že prozánětlivý buněčný fenotyp je ve větší míře přítomný právě u starších lidí. Způsobuje to zvýšená exprese genů spojených s imunitními odpověďmi a zánětem ve tkáních (de Magalhães et al., 2009; Swindell, 2009).

2.2.3 Porucha stability a funkce proteomu

Proteostáza (homeostáza proteinů) je koncept biologických drah, starající se o tvorbu, kontrolu a degradaci proteinů v buňce. Má složitou síť kontrolních mechanismů, které zajišťují správnost složení proteinů a zamezují hromadění těch defektních, špatně složených (*Koga et al., 2011).

Mechanismy kontrolující kvalitu syntetizovaných proteinů se dělí do dvou hlavních složek, kterými jsou autofagicko-lysozomální systém a ubiquitin-proteazomový systém. S narůstajícím věkem činnost těchto systémů a tím i kontrola kvality sbalení proteinů klesá (Tomaru et al., 2012).

2.2.4 Epigenetické faktory

Epigenetické mechanismy determinují genovou expresi bez zasahování a přestavby sekvence DNA. Výskyt těchto post-replikačních modifikací je patrný zejména na cytosinech v dinukleotidové sekvenci CpG (Issa, 2000). Následkem modifikací dochází k remodelaci chromatinu, změnám ve vzorech metylace DNA, nebo se projeví na post-translačních modifikacích histonů. Jsou to povětšinou fyziologické procesy, nezbytné při správném vývoji organismu. Studie však ukázaly, že se ve stáří

epigenetické modifikace hromadí a mohou přispívat k rozvoji chorob a projevů spojených se stárnutím (Talens et al., 2012).

Důležitou vlastností epigenetických alterací, je jejich reversibilita. Na rozdíl od genetických mutací, může být epigeneticky modifikovaná DNA navrátna do původního stavu. Vzhledem k tomu, že je tento fenomén považován za znak stárnutí, dá se do budoucna uvažovat o terapii zaměřené právě na epigenetické faktory stárnutí a oddálit tak tolik obávané projevy stárnoucího organismu. Experimenty s léčbou byly však zatím většinou prováděny pouze na myších (Krishnan et al., 2011; Peleg et al., 2010).

2.2.5 Vyčerpání kmenových buněk

Jednou z hlavních charakteristik kmenových buněk je jejich pluripotence. Jsou schopné se diferencovat v různé buněčné typy, nahrazovat poškozené, opotřebované buňky a tím obnovovat tkáň. Hrají důležitou roli v homeostatické údržbě mnoha orgánů, zejména pak orgánů s tzv. „vysokým obratem“, jimiž jsou například střeva a kostní dřeň (Caplan, 1991).

Nejvíce patrný úbytek kmenových buněk v důsledku stárnutí byl objeven v hematopoetických procesech (Kuranda et al., 2011; Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2005). Aktivita hematopoetických kmenových buněk se u starších jedinců snižuje, buňky se méně dělí a zároveň zde byla objevena vyšší koncentrace poškození DNA (Rossi et al., 2007).

2.2.6 Inzulinová signální dráha a deregulované snímání živin

Velkým fenoménem posledních let je kalorická restrikce, která by měla dle výzkumů výrazně ovlivňovat délku a kvalitu života v pozitivním smyslu (Fontana et al., 2010; Walford et al., 2002). Omezení příjmu kalorií ovlivňuje mnoho tělních drah a mechanismů. Jednou z nejvýraznějších je inzulinová signální dráha.

Komponent intracelulární signální dráhy, inzulinový růstový faktor (IGF-1) (*Laron, 2001), je jako mediátor produkován různými typy buněk v reakci na přítomnost růstového hormonu (GH) (Rinderknecht and Humbel, 1976). Cílem kaskády je informovat o přítomnosti glukózy. Mezi další komponenty této evolučně konzervované dráhy patří komplexy mTOR (Heitman et al., 1991) a rodina transkripčních faktorů FOXO (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004).

Genetické manipulace a mutace, které snižují intenzitu inzulinové signální dráhy, bývají spojovány s prodloužením života jak u drobných bezobratlých, tak u větších savců včetně člověka (Pawlikowska et al., 2009).

2.2.7 Mitochondriální dysfunkce

Nejvíce kontroverzním faktorem vstupu buňky do senescentního stádia jsou nejspíše dysfunkční mitochondrie. S buněčným stárnutím je narušena i jejich produktivita, účinnost dýchacího řetězce klesá spolu s tvorbou ATP a zvyšuje se množství elektronů, které z řetězce unikly (Shigenaga et al., 1994). Následkem toho se v buňce začnou hromadit volné oxidové radikály (ROS), kolem kterých se točí veškerá kontroverze. Zpočátku se totiž předpokládalo, že hlavní vlastností ROS je poškozování buněčných makromolekul vedoucí k rychlejšímu stárnutí buněk (Harman, 1965). Teorie je v zásadě pravdivá, protože pokud jsou ROS ve vysoké koncentraci, vážně poškozují buněčné proteiny, lipidy a také nukleové kyseliny. Zejména poškození mtDNA je značným problémem, protože její reparace je obtížná a složitá (Yakes and Van Houten, 1997). Pokud nedojde k opravě, mohou vznikat mutace způsobující závažná onemocnění.

Fakt, že některým buňkám vyhovuje menší koncentrace kyslíku, než se předpokládalo, vyšel najevo už téměř před padesáti lety. Konkrétně pak výzkumem diploidních lidských fibroblastů, které v hypoxickém prostředí vykazovaly delší replikační fázi (Packer and Fuehr, 1977).

Bylo provedeno značné množství experimentů, nicméně výsledky byly často protichůdné. Na počátku 21. století se začaly objevovat další názory a teorie, které naznačují, že ROS mají důležitou roli v signalizaci. Podporují také metabolické dráhy a podle některých názorů mají i pozitivní vliv na délku života (Hekimi et al., 2011). Negativní účinek dysfunkčních mitochondrií je však stále považován za významnější, jelikož je doložen mnoha výzkumy (Trifunovic et al., 2004; Vermulst et al., 2008).

Nedávno se též začalo mluvit o hormetickém účinku dysfunkčních mitochondrií a jejich produktů ROS. Pojem hormeze je definován jako kladná reakce organismu na nízké dávky látek, které by při větším množství způsobily výrazně patologické stavy (Calabrese et al., 2007). Reaktivní oxidové radikály jsou ve vysoké koncentraci fatálním problémem, avšak v menším množství mohou vyvolat příznivé kompenzační mechanismy s příznivým vlivem na buňku (Calabrese et al., 2011; Singh et al., 2015).

2.3 Přechod do senescentního stádia

Prvním společným bodem v procesu přechodu je tzv. "growth arrest" neboli zastavení buněčného růstu. Obvykle se tento proces odehrává v G1 fázi buněčného cyklu. Buňky nejsou schopny replikace DNA, tím pádem i dalšího dělení, ale zůstávají metabolicky aktivní (Di Leonardo et al., 1994).

Většina buněk se do senescentního stádia dostane díky telomerovému kontrolnímu bodu. Ten má za úkol zajistit tento přechod v případě, že jsou telomery příliš krátké a je zde riziko poškození kódující

DNA (Griffith et al., 1999). Za všemi ostatními typy senescence (jmenovitě replikativní senescence, stresem vyvolaná předčasná senescence, senescence způsobená onkogeny a senescence způsobená protinádorovou léčbou) stojí, dle aktuálních důkazů, hlavně trvalé poškození DNA a následná odpověď na tato poškození (DDR). Není to však úplným pravidlem. K přechodu do senescentního stádia stačí v některých případech (např. u programované senescence, která je velmi důležitá ve vývoji) pouze aktivace souboru procesů reagujících na poškození DNA, bez skutečného poškození DNA (Bielak-Zmijewska et al., 2018).

Aktivátory DDR jsou tedy povětšinou praskliny cukr-fosfátové kostry, které mohou vést ke vzniku jednovláknových oblastí na deoxyribonukleotidové kyselině nebo k jejímu úplnému přerušení, čímž se vytvoří dvouvláknové zlomy na dvoušroubovici DNA (Robles and Adami, 1998).

V laboratorních podmínkách, pokud jsou zachovány životní podmínky, mohou senescentní buňky se zachovalou metabolickou aktivitou, přežívat teoreticky věčně. Jsou však neschopné proliferace. V organismu je jejich životnost různá a jen málo předvídatelná. Senescentní melanocyty mohou v těle přetrvávat několik let (Michaloglou et al., 2005), zatímco senescentní jaterní buňky asociované s rakovinou jater jsou po detekci co nejrychleji odstraněny makrofágy (Xue et al., 2007).

Organismus je neustále vystavován stresorům z vnitřního i vnějšího prostředí, které mohou napomáhat přechodu do senescentního stavu (Bielak-Zmijewska et al., 2018). Konkrétně k výskytu senescentních buněk může vést celkové stárnutí organismu (Dimri et al., 1995), onkogeny (Serrano et al., 1997), cytokinová léčba (Braumüller et al., 2013) či chemoterapie (Schmitt et al., 2002). Další faktory jsou předmětem současných výzkumů.

2.4 Odpověď na poškození DNA

Hned po rozeznání lézí poškozené DNA, je v závislosti na povaze poškození spouštěna specifická reakce, která aktivuje opravné mechanismy. Vzhledem k variabilitě vzniku lézí na DNA, jsou variabilní i způsoby, jakými se poškozené vlákno opraví. Například ultrafialové záření způsobuje na nukleové kyselině nechtěné zdvojování pyrimidinových bází, a aby nedošlo k poruchám při replikaci či transkripci, postarají se o reparaci nukleotidové excizní proteiny (NER) (*de Laat et al., 1999). V případě poškození ionizačním zářením, se dvouvláknové zlomy opravují buď homologní rekombinací, nebo nehomologním spojením konců vlákna (*Featherstone and Jackson, 1999).

Oprava je zajištěna buď hned na místě (*in situ*), nebo se celý úsek odstraní a znovu doplní (Takata et al., 1998). Kromě mechanismů zajišťujících opravení, se aktivují i kontrolní body, které v případě potřeby mohou vést k zastavení buněčného cyklu (*Lowndes and Murguia, 2000).

Patologické změny na DNA mohou vést ke změnám profilů genové exprese (Amundson et al., 2001; Jelinsky et al., 2000; Sesto et al., 2002). Experimenty zkoumající odpovědi na dvouřetězcové zlomy (DSB) byly prováděny na kvasinkách, nicméně se u všech eukaryotních organismů liší pouze variabilitou homologů PIK kináz.

2.4.1 Signalizační kinázy

Po prvotním zaregistrování patologických změn na DNA se spustí kaskáda vedoucí až k regulaci probíhajícího buněčného cyklu. Zásadním krokem v tomto procesu je transport signalizačních kináz ATM (zkratka z angl. Ataxia-telangiectasia mutated), ATR (zkratka z angl. Ataxia-telangiectasia and Rad3), pocházejících z rodiny fosfatidilinositol-3-kinázových kináz (PIKK). Některé zdroje k nim ještě zařazují katalytickou podjednotku DNA dependentní protein-kinázy (DNA-PKcs) (Falck et al., 2005). Všechny mají stejný úkol, avšak mechanismus, jejich působení a je trochu odlišný.

ATM a ATR jsou klíčovými regulátory buněčné odpovědi na DNA poškození, navzájem se od sebe liší, ale způsob jakým se dostávají do místa poškozené DNA je zjevně analogický a probíhá přes konzervované interakční motivy nacházející se v proteinech Nbs1 (pro ATM), ATRIP (pro ATR) a Ku80 (pro DNA-PKcs). Delece těchto motivů narušuje přístup PIKK do míst poškozené DNA. Tím je ohrožen sled všech dalších signálních událostí, které se spouštějí v reakci na detekci DNA lézí (Falck et al., 2005; Jazayeri et al., 2006).

Například v případě ztráty aktivity ATM, dochází k výrazné genomové nestabilitě způsobené nedostatky v reakcích na dvouvláknové zlomy chromatinu a vadnou aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu. Projevy tohoto stavu byly poprvé popsány ve dvacátých letech 20. století (Syllaba K, Henner K, 1926) a o 40 let později byly tyto příznaky popsány jako autosomálně recesivní porucha s názvem Ataxia-telangiectasia (A-T) (Boder and Sedgwick, 1958). Molekulárně se jedná o mutaci genu *ATM* lokalizovaného v lidském genomu na 11. chromozomu, která způsobuje inaktivaci či úplnou eliminaci proteinu ATM (*Lavin and Shiloh, 1997). Projevuje se imunodeficiencí, neurogenním poklesem a zvýšeným výskytem malignit (Gotoff et al., 1967).

2.4.2 Signalizační odpověď na poškození DNA

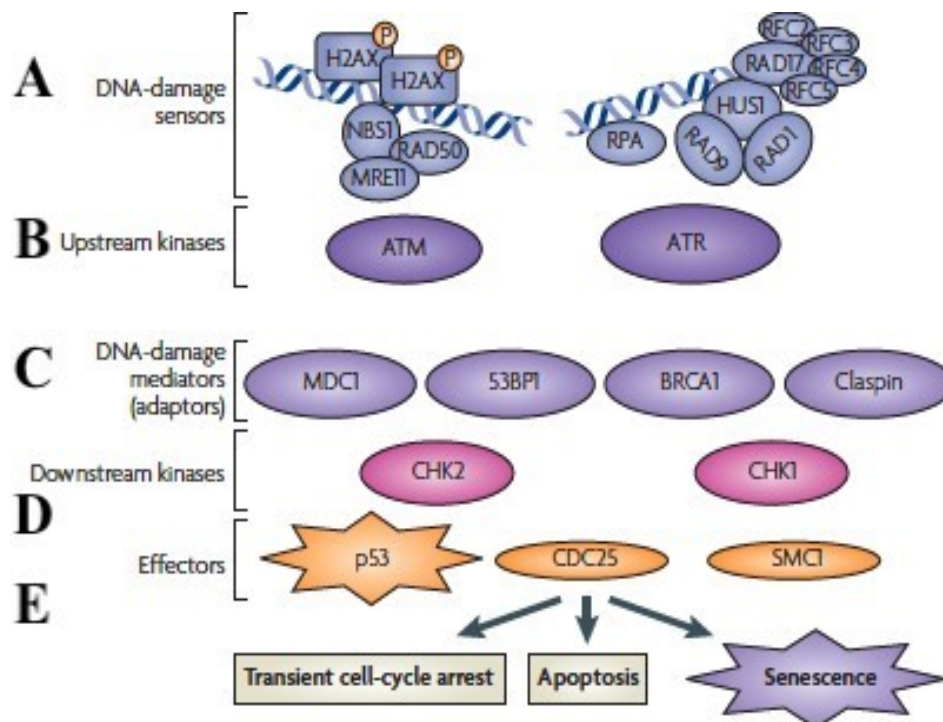
Prvním bodem v kaskádě reagující na DNA poškození musí být zákonitě rozpoznání onoho poškození pomocí PIK kináz. ATM rozeznává dvouvláknové zlomy pomocí multiproteinového senzorového komplexu MRN složeného z proteinů MRE11, RAD50 a NBS1 (Falck et al., 2005; Lee and Paull,

2005). Následně je spuštěna fosforylační kaskáda, aktivující DNA opravné mediátory, kterými jsou 53BP1, MDC1/NFBD1 a NBS1 a další (Chapman et al., 2012; Karlseder et al., 1999). V tomto bodě se odehrává i fosforylace serinu 139 na H2AX histonu, čímž se optimalizují opravné aktivity na chromatinu (Bakkenist and Kastan, 2003; Stiff et al., 2004). Aktivovaná ATM stojí také za fosforylací CHK2 na threoninu 68. Dalším bodem spadajícím pod kinázu ATM je interakce CHK2 s tumorovým proteinem p53, čímž se podpoří zastavení buněčného cyklu zvýšením transkripce proteinu p21 a stresových senzorů GADD45 (Chehab et al., 2000; Wang et al., 1999).

Aktivační dráha ATR je o něco složitější a zahrnuje více komponentů. Iniciací procesu je vytvoření jednovláknových úseků na dvouvláknové DNA zastavením replikační DNA polymerázy a oddělením replikativní helikázy od replikační vidlice (Byun et al., 2005). Do jednovláknového zlomu se naváže replikační protein A (RPA), ke kterému se následně přidá komplex ATR kinázy a ATR interagujícího proteinu (ATRIP) (Costanzo et al., 2003; Falck et al., 2005; Zou and Elledge, 2003). Společně s nimi je v místě poškození přítomný i aktivátor ATR – vazebný partner Topoizomeráza 1 (TOPOTB1) a tzv. kontrolní svorka, kterou je komplex 911 složený z proteinů Rad9-Rad1-Hus1 (Delacroix et al., 2007). Ve spolupráci s těmito komponenty, zahájí aktivované ATR fosforylaci kinázy kontrolního bodu 1 (CHK1), která svým účinkem mimo jiné pomáhá stabilizovat zastavené replikační vidlice (Feijoo et al., 2001) a tím zabránit buňce vstoupit do mitózy a usnadnit opravu DNA (*Chen and Sanchez, 2004; Cimprich, 2003).

Důležitou rolí CHK1 je také regulace kontrolních bodů prostřednictvím cyklin-dependentních kináz (CDK) a to udržováním či zvyšováním jejich inhibiční fosforylace pomocí efektorového proteinu CDC25 (Peng et al., 1997; Sørensen et al., 2003).

Úlohou efektorových proteinů p53, CDC25 a SMC1 je tedy přímá regulace buněčného cyklu. Rozhodují, zda a ve které fázi se buněčný cyklus zastaví, bude-li to zastavení trvalé či dočasné, nebo jestli buňka zanikne v průběhu apoptózy (Obr. 2).



Obr. 2: Komponenty procesu odpovědi na poškození DNA.

A. Senzory buněčného poškození – jejich akumulace v ložiskách poškozené DNA. Klíčovým procesem přenosu signálu je zde fosforylace (serinu na H2AX, komponentů MRE komplexu, proteinů kontrolní svorky), která aktivuje řadu dalších komponentů. **B.** Signalizační kinázy rodiny fosfatidylinositol-3-kinázových kináz (PIKK) – nejvýraznější komponenty celé signalizační řady. **C.** Mediátory – proteiny zapojené do oprav DNA a regulace zástavy buněčného cyklu. Patří k nim například tumor-supresorové proteiny ovlivňující procesy oprav DNA přes homologní rekombinaci (BRCA1, BRCA2), mediátory kontrolního bodu (MDC1), nebo nestabilní protein Claspin (hraje roli v ukončení zastavení buněčného cyklu přes kontrolní bod). **D.** Transdukční kinázy kontrolního bodu – CHK1 a CHK2 - aktivují se fosforylací signalizačními kinázami PIK na serinu/threoninu a ovlivňují řadu drah kontrolního mechanismu buněčného cyklu. **E.** Efektorové molekuly – přímo organizují zastavení buněčného cyklu. Řadí se k nim protein SMC1 (rodina ATPáz), fosfatáza CDC25 a důležitý tumorový antigen p53 (známý také jako jaderný tumor-supresor p53) (upraveno a převzato z *Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Výše uvedené mechanismy jsou pouze obecným zjednodušením celého procesu regulace buněčného cyklu. Je v něm zapojeno mnohem více komponentů a faktorů, než je v předchozích odstavcích popisováno. Ty tvoří složitou propojenou síť procesů, jež stále není kompletně prozkoumána. Průběh regulace buněčného cyklu je však zásadní pro osud buňky, ve které probíhá.

3 Telomerová teorie

Fyziologickou příčinou přeměny aktivní zdravé buňky na buňku se senescentním fenotypem je zkracování telomer. Tento jev je pozorován ve velké škále eukaryotních organismů, od kvasinek přes rostliny až po savce. Prokaryota mají většinou chromozom cirkulární, proto se jich tento jev netýká. S každou duplikací genomu se konce telomer o malé procento zkrátí a jsou o krok blíže poslední životní fázi před smrtí.

Faktorů ovlivňujících přechod buněk do senescence je mnoho, od působení volných kyslíkových radikálů (ROS), až po indukci senescence onkogeny (Serrano et al., 1997). Na rozdíl od zkracování telomer způsobeného fyziologicky buněčným dělením, jsou tyto faktory individuální. Mohou se u každého organismu projevit odlišným způsobem, za rozdílný časový úsek a v různé formě.

3.1 Objev telomer

S pojmem „telomera“ poprvé přišel americký genetik Hermann J. Muller už v první polovině 20. století. Byl i jedním z prvních biologů, kteří se zabývali problematikou konců lineárních chromozomů v souvislosti s jejich stabilitou (Muller, 1938). Na jeho práci o několik let později navázala americká cytogenetička Barbara McClintock, která se snažila pochopit, proč opravné mechanismy zaměřující se na náhodné zlomy DNA nepostihují i ony volné konce chromozomů. Postupem času přišla na to, že telomery na sobě mají ochranné struktury, které těmto procesům brání. Molekulární podstatu věci však neodhalila (McClintock, 1941).

Pojem „Telomerová teorie“ je velmi úzce spjat s již zmiňovaným jménem Leonard Hayflick. Jeho poznatek, že většina kultivovaných buněk je schopna přežít po určitý počet dělení, výrazně přispěl k pochopení problematiky stárnutí. Limitu buněčného dělení se říká Hayflickův limit a je pravděpodobně vysvětlením, proč fyziologické mechanismy s věkem organismu slábnou a zaostávají (Hayflick and Moorhead, 1961).

Dalším důležitým milníkem ve zkoumání telomer bylo zjištění, že DNA polymerázy nejsou schopny úplné replikace konců chromozomových vláken, protože ke své činnosti vyžadují RNA primer. S každým dělením genomu by tedy došlo ke ztrátě několika nukleotidů DNA vlákna, což by způsobovalo značné problémy. Na tuto teorii přišli nezávisle na sobě dva vědci, Američan James Watson (Watson, 1972) a Rus Alexey Olovnikov (Olovnikov, 1973).

Molekulární podstatu konců chromozomů objasnila Elizabeth Blackburnová. Na koncích chromozomů objevila opakující se hexanukleotidové sekvence důležité pro úplnou amplifikaci a replikaci chromozomů (Blackburn and Gall, 1978). Následně se ve spolupráci s Jackem Szostakem, snažili přijít na princip, který umožňoval udržení molekuly rDNA Tetrahymeny v lineární formě. Provedli experiment, ve kterém přidávali opakující se konce chromozomů Tetrahymeny na DNA vlákna kvasinkových plazmidů a pozorovali stabilitu linearizovaného plazmidu (Szostak and Blackburn, 1982). Ve většině případů hybridní plazmidy zůstávaly v lineární formě, čímž se funkce repetitivních sekvencí potvrdila. Dlouho na sebe nenechal čekat ani objev enzymu telomerázy (Greider and Blackburn, 1985). Přestože se hexamery repetitivních sekvencí liší pořadím nukleotidů druh od druhu, jsou mechanismy údržby telomer evolučně velmi konzervované (Lejnine et al., 1995). Výsledky pokusů prováděných na primitivních Tetrahymenách poskytly tedy dobrou představu o tom, jak to probíhá v lidském genomu.

3.2 Struktura telomer

Telomery jsou koncovou strukturou lineárních chromozomů. Jsou složené z opakujících se úseků DNA, které mají u člověka sekvenci (TTAGGG) $_n$ a mohou být přítomny až v několika tisících repeticiích za sebou (Moyzis et al., 1988). Délka neboli počet opakování repetitivního úseku telomery je specifická pro každou buňku. Pohybuje se v rozmezí od 20kpb v zárodečných tkáních, po 2kpb v senescentních buňkách (Levy et al., 1992). Průměrná délka telomery závisí na replikační historii, faktorech a stresorech z vnějšího prostředí (Epel et al., 2004) a částečně je také dědičnou vlastností (Slagboom et al., 1994).

Telomera je dvouvláknovou strukturou, ne však po celé své délce. Jedno z vláken (3') se vyznačuje dlouhým přesahem bohatým na guanin, který se podílí na tvorbě sekundární struktury, tzv. T-smyčky (anglicky t-loop), která je nezbytná pro správnou replikaci telomer. Převís je 3-600nt dlouhý, přičemž záleží nejen na stáří a typu buňky, ale i na druhu organismu, ve kterém se nachází. Dosud není přesně známý mechanismus, jakým tento přesah vzniká.

3.3 Ochrana telomer

Telomery samy o sobě slouží jako ochranný komponent DNA. Jsou takzvanou chromozomovou čepicí. Jejich ochranná funkce však není dostatečná, proto je do protekčních mechanismů zapojeno mnoho dalších struktur a procesů. I přes to všechno však není zaručena 100% ochrana.

3.3.1 T-smyčka

Jedním ze způsobů ochrany koncových částí chromozomů je tvorba velké sekundární struktury na konci telomery, které se označuje jako t-smyčka. Vzniká invazí 3'vlákna do dvouvláknové oblasti telomery, přičemž její obvod bude tak velký, jak dlouhý bude 3'převís. Stabilizaci celé struktury zajišťuje párování bází a interakce mezi proteiny (Griffith et al., 1999).

Podmínkou vzniku t-smyčky je nezbytná přítomnost tandemové repetice na vláknech DNA, ne však lokalita konce chromozomů. Podobné útvary byly pozorovány i na koncích mitochondriální DNA u Tetrahymeny (Goldbach et al., 1979), kde se právě vyskytovaly konzervované opakující se sekvence nukleotidů (Morin and Cech, 1988).

Klíčovou rolí t-smyček je pravděpodobně sekvestrace přesahujícího konce a tím i jeho ochrana před fúzí. Tyto útvary participují v mnoha dalších důležitých procesech a jejich absence či poškození může vyvolat fatální scénář událostí končící senescencí nebo apoptózou (Griffith et al., 1999).

3.3.2 Shelterin komplex

Velký podíl na ochraně telomerických struktur má komplex šesti telomerických proteinů zvaný Shelterin. Prvním popsáným byl TRF1 (z angl. Telomere Repeat binding Factor 1) izolovaný z HeLa buněk. Byl objeven díky jeho specifitě pro dvouvláknové repetice (TTAGGG)_n (Bianchi et al., 1997). Následoval objev TRF2, který byl identifikovaný jako paralog TRF1 (Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). Dále TIN2 (TRF1- a TRF2-Interagující jaderný Protein 2), který stabilizuje komponenty Shelterin komplexu tím, že vytváří mezi nimi „můstky“, kterými propojuje proteinové jednotky připojené k dvouřetězcové nebo jednořetězcové DNA (Kim et al., 1999). Rap1 (represorový / aktivátorový protein 1) je také stabilizující protein, který interaguje s TRF2 a inhibuje opravy na DNA. Vzhledem k tomu, že postrádá schopnost navázání se na DNA (Li et al., 2000), musí interagovat s TRF2, aby se dostal do oblasti telomer. TPP1 (dříve TINT1) má za úkol zprostředkovávat aktivaci telomerázy a prodloužení telomer a je úzce spjat s proteinem POT1 (z angl. Protection of Telomere 1). Ztráta nebo nedostatek TPP1 vede tudíž k narušení funkce POT1 (Nandakumar et al., 2012). Vysoce konzervovaný protein POT1 je posledním proteinem z Shelterin rodiny, který vykazuje velkou afinitu k jednovláknové oblasti telomery. POT1 se váže do této oblasti tzv. OB-záhyby, které chrání telomeru před degradací a také zakrývá 3'G převís. Účastní se také inhibicí oprav DNA zprostředkovanou ATR. Tento protein byl identifikován díky jeho homologii s faktory přítomnými na chromozomech jednobuněčných eukaryot (Baumann and Cech, 2001). Nukleáza Apollo je pak faktorem, který se také zapojuje do ochrany před opravami DNA, ale nepatří přímo do Shelterin komplexu. Tato nukleáza zabraňuje opravám DNA prostřednictvím

nehomologního párování zakončení (NHEJ) (Lam et al., 2010). Shelterin komplex se také jako celek aktivně podílí na regulaci funkce enzymu telomerázy.

3.3.2.1 TRF1 a TRF2

Ochranu telomer zajišťuje kromě Shelterin komplexu mnoho dalších proteinů. Například jsou to negativní regulátory délky telomer tankyráza a Pin2 protein. Většina z nich se k DNA dostává prostřednictvím molekul TRF1 a TRF2 (Smith et al., 1998; Zhou and Lu, 2001). Jak již bylo naznačeno, TRF1 a TRF2 jsou proteiny s afinitou k dvouvláknové DNA a váží se po celé délce telomer (Chong et al., 1995; Zhong et al., 1992). Tyto dva proteiny mají na úrovni primární struktury hodně společného. Oba se vyznačují přítomností DNA vazebné domény Myb typu na C–konci a N–terminální dimerizační domény TRF homologie. Přesto mají tyto proteiny na telomerách zcela odlišné funkce.

TRF1 působí jako negativní regulátor délky telomer tak, že blokuje přístup k telomeráze (van Steensel and de Lange, 1997). Naproti tomu TRF2 slouží k přímé ochraně telomer tím, že se vyskytuje na jejich povrchu ve stovkách kopií během všech fází buněčného cyklu. Udržuje také nepárový jednořetězcový 3' přesah a tím se podílí na správné konfiguraci G–řetězce. Nedostatek TRF2 se projevuje fenotypem podobným stavu při kritickém zkracování telomer. Projevuje se častějším výskytem chromozomových aberací, translokací a anafázovými můstky, u kterých je riziko, že se nerozpojí a dojde ke změnám v počtu chromozomů (Benn, 1976). Ztrátou tohoto proteinu dochází k fúzím konců chromozomů (van Steensel et al., 1998).

3.3.3 DNA-PKcs a Ku 70/80

Katalytická podjednotka DNA dependentní protein kinázy (DNA-PKcs) a heterodimerní Ku protein společně tvoří komplex DNA dependentní serin/threonin protein kinázy. Mimo úlohy v opravách DNA prostřednictvím VDJ rekombinace a NHEJ, má důležitou funkci v ochraně chromozomálních konců. Přes posttranslační modifikace ovlivňuje telomerická zakončení a tím předchází jejich fúzi (Bailey et al., 1999).

3.3.4 RNA molekuly telomerických repetice

RNA molekuly obsahující telomerické repetice (TERRA) jsou celkem nedávným objevem, který, jak se zdá, má důležitou roli při ochraně chromozomových konců (Azzalin et al., 2007). Telomery nejsou transkripčně tiché nekódující oblasti, jak se dříve předpokládalo. Dochází k aktivnímu přepisu subtelomerických částí směrem k chromozomovým koncům, čímž vznikají ony TERRA molekuly. Obsahují v sobě repetitivní sekvence UUAGGG a jejich délka je variabilní (100pb-9kpb).

Lokalizovány jsou v jádrech savčích buněk, kde asociují s telomerami a přispívají k udržování jejich stability (Schoeftner and Blasco, 2008).

3.4 Replikační problém telomer

Po narození mají téměř všechny mladé buňky plnou telomerovou „výbavu“. Na koncích chromozomů buněk novorozence je 10-15 kpb tandemově se opakujících repetice a s každým buněčným dělením se kousek telomery odstraní. Tomuto jevu se říká replikační problém telomer a společně s náchylností telomerických konců na poškození, je to jedna ze dvou největších nevýhod lineárních chromozomů.

Příčinou zkracování telomer je neschopnost DNA polymerázy replikovat obě vlákna dvouřetězcové DNA až do úplného konce. Jak je známo, všechny objevené DNA polymerázy replikují vlákno deoxyribonukleové kyseliny ve směru 3'-5', čímž rozdělují vlákna na zaostávající a vedoucí (anglicky leading a lagging strand). Replikace začíná na středu DNA řetězce. Po vedoucím 3'-5' vlákně DNA polymeráza hladce postupuje a vytváří komplementární vlákno ve směru 5'-3'. Na replikaci druhého, opožděného DNA vlákna musí replikační aparát buňky vynaložit větší úsilí. Postupně je syntetizováno a komplementováno z krátkých oddělených segmentů. Klíčový je zde enzym s katalytickou funkcí – primáza, který podle templátového vlákna zprostředkovává syntézu krátkých komplementárních RNA primerů. Ty jsou následně DNA polymerázou rozšířeny za vzniku Okazakiho fragmentů. RNA primery jsou v dalším kroku odstraněny a nahrazeny fragmenty DNA, které vzápětí spojí enzym ligáza. Tento mechanismus funguje po celé délce řetězce, nicméně na jeho konci vzniká problém. Důvodem je, že při nahrazování RNA primerů úseky DNA je nutné, aby před RNA segmenty bylo DNA vlákno. To ale není možné u posledního RNA primeru na řetězci, proto dojde k jeho degradaci a tím i zkrácení vlákna DNA (*Masai et al., 2010). Po replikaci DNA je konec řetězce tupě zakončen, a proto musí být 5' konec resekován, aby se vytvořil jednořetězcový přesah 3'.

V momentě, kdy se zkrátí telomery na kritickou délku, tzn. je dosaženo Hayflickova limitu, nastává pro buňku kritické období. Buňka má poté tři možnosti. Buď přijme senescentní fenotyp (replikativní senescence), nebo ukončí svůj život apoptózou a nebo se může transformovat v nádorovou buňku.

Tento zásadní problém s replikací se dá potenciálně vyřešit několika způsoby. Nejznámější z nich je aktivita enzymu telomerázy. Ta svou funkcí reverzní transkriptázy syntetizuje a přidává repetice ztracené dělením buňky zpět na konce telomer (Greider and Blackburn, 1985).

3.5 Telomeráza

Telomeráza byla objevena na konci 20. století v genomu *Tetrahymeny* jako enzym s terminální transferázovou aktivitou (Greider and Blackburn, 1987, 1985). Z biochemického pohledu je to telomerázový holoenzym, který má ve svém jádře zakomponovanou vlastní integrální telomerázovou RNA molekulu (TR, TERC nebo TER, u člověka hTR), která se skládá ze tří hlavních domén důležitých pro katalytickou aktivitu telomerázy (Feng et al., 1995). První je vnitřní šablona pro telomerickou syntézu, další je pseudoknot a třetí je HACA koncová doména. Vzhledem k přítomnosti vlastního řetězce RNA, je na místě označit telomerázu jako ribonukleoprotein (RNP) (Egan and Collins, 2010). Genetická informace obsažená v RNA podjednotce slouží jako templát pro syntézu opakujících se úseků vlákna DNA na telomerách (Greider and Blackburn, 1989). V jádře se také nachází telomerázová reverzní transkriptáza (TERT) (Lingner et al., 1997), která společně s TERC tvoří základní minimální složku telomerázy nutnou pro její katalytickou aktivitu.

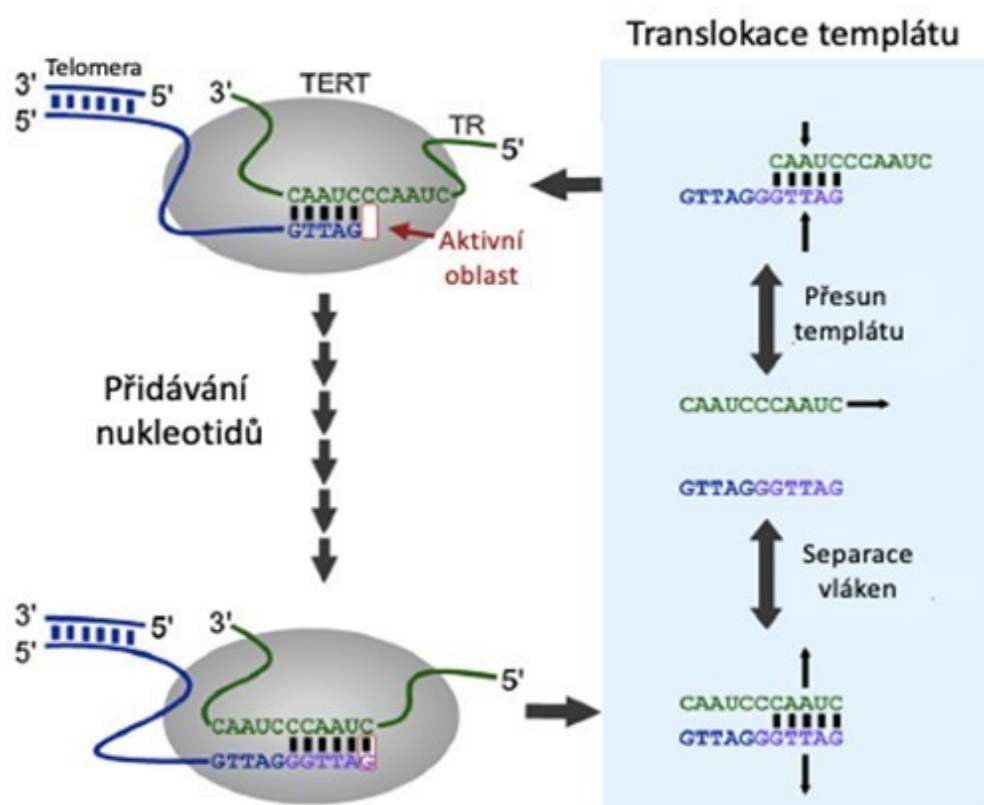
Telomeráza byla u lidských buněk poprvé objevena u epiteliální linie HeLa buněk odvozených z nádoru děložního hrdla (Morin, 1989). Následovala lokalizace telomerázy v mnoha dalších typech nádorových linií (Kim et al., 1994). V kulturách normálních somatických buněk člověka však telomerázová aktivita většinou nebyla detekována. Z těchto výzkumů jasně vyplývá, že telomerázu mají prokazatelně buňky časného vývoje, embryonální kmenové buňky a již zmiňované rakovinové linie (Broccoli et al., 1995; Wright et al., 1996). Z nedostatku telomerázy se mohou vyvinout závažná orgánová onemocnění, jako například plicní fibrózy (Armanios et al., 2007) či syndromy selhání aktivity kostní dřeně jako je kongenitální dyskeratóza (Mitchell et al., 1999).

Telomerázový mechanismus je evolučně velmi dobře a hluboce konzervovaný přes mnohobuněčné, od bičíkatých prvoků a trypanosom až po vyšší rostliny a živočichy. Homologie se sice evolučně potvrdila, nicméně například TERC podjednotka je variabilní v souvislosti s druhem organismu, ve kterém se nachází a liší se, jak délkou, tak svou sekvencí (*Podlevsky and Chen, 2016).

Jádro telomerázového ribonukleoproteinu může interagovat s množstvím přídavných komponentů. Mezi tyto komponenty patří například dvě skupiny malých nekódujících RNA fragmentů, které se podílejí na modifikaci RNA: malá Cajalova RNA tělíska (scaRNA) (Darzacq et al., 2002) a malá nukleární RNA tělíska (snRNA) (Balakin et al., 1996). Dále například dyskerin, což je protein vázající RNA, který rozeznává H/ACA sekvenční motiv a podporuje biogenezi ribonukleoproteinů telomerázy. Patří k nim ještě také skupina asociačních proteinů NOP10, NHP2 a GAR1. V závislosti na druhu organismu, může být toto spojení dočasné či trvalé a je regulováno prostřednictvím buněčného cyklu.

3.5.1 Mechanismus účinku telomerázy

Jak již bylo řečeno, RNA podjednotka telomerázy u člověka slouží jako templát pro syntézu nových jednovláknových repetitivních úseků 3' řetězce DNA a obnovuje tím délku telomer. Díky analýze genu kódujícího hTR podjednotku je známo, že jeho sekvence obsahuje i zabudovanou jednovláknovou sekvenci 3'CAAUCCCAAUC-5', která je komplementární k jednomu celému telomerickému repetitivnímu hexanukleotidu (Feng et al., 1995). Templátová oblast RNA molekuly nasedá 3' koncem na nejkontinuálnější repetici G-převisu DNA telomery. Tím se generuje primer potřebný pro aktivitu reverzní transkriptázy. Nově vznikající telomerická sekvence je poté syntetizována ve směru 5'-3'. Dalším krokem je translokační událost, při které se přesune RNA templát a proces může běžet opakovaně. C-konec lze dosyntetizovat klasickou DNA polymerázou (viz Obr. 3).



Obr. 3: Replikační cyklus lidské telomerázy.

Proces je rozdělen do dvou hlavních bloků, kterými jsou přidávání nukleotidů (vlevo) a přemístění replikační šablony (vpravo). Jakmile se spojí katalytické jádro telomerázy (TERT a TR) s DNA primerem (modrá), přidá se šest nukleotidů podle sekvence TR. Templát se může začít regenerovat. Jednovláknové řetězce DNA (modrá) a RNA (zelená) se od sebe oddělí a RNA šablona se může posunout dál, aby podle ní mohla být telomera prodloužena o další repetitivní úsek (převzato a upraveno z *Podlevsky and Chen, 2012)

Míra účinnost telomerázy je také odrazem podmínek okolního prostředí. Bylo popsáno mnoho faktorů, které mohou ovlivnit účinnost telomerázy, jako například koncentrace substrátů (primer a dNTP),

teplota, sekvence primerů nebo přítomnost jednotek interagujících s G- kvadrupelem (Sun et al., 1999).

3.5.2 Regulační mechanismy enzymu telomerázy

Zjednodušeně lze funkci telomerázy popsat několika málo větami, ale ve skutečnosti zahrnuje řadu složitých regulačních mechanismů, kde je zapojeno mnoho různých komponentů. Tyto procesy, i přes markantní rozvoj vědy v posledních letech, stále nejsou u člověka zcela popsány a pochopeny.

3.5.2.1 Hsp90, p23, Ku70\80

Heat-shock protein 90 (Hsp90), patřící do rodiny chaperonových proteinů, slouží jako pomocný protein při sbalování ostatních proteinů, stabilizuje je vůči tepelnému stresu a má úlohu i při jejich degradaci. V případě interakce s telomerázou, hraje společně s proteinem p23 roli při jejím vzniku. Váží se na její hTERT podjednotku telomerázy a aktivně se podílí na jejím skládání (Holt et al., 1999).

Heterodimerní protein Ku má nejspíš také podíl na regulaci telomerázové aktivity. Poměrně pevně se váže k proteinům TRF1 a TRF2, které jsou součástí Shelterin komplexu. Následně dochází k vazbě těchto proteinů v dvouvláknové oblasti telomerázy a tím snižuje její schopnost dosáhnout až k obnaženému 3' konci. Z toho vyplývá, že interakce Ku proteinu s proteiny Shelterin komplexu způsobuje pokles aktivity telomerázy (Chai et al., 2002).

3.5.2.2 Regulace telomerázy pomocí Shelterin komplexu

Repetitivní oblasti telomer jsou v případě regulačních mechanismů zásadní, protože se na ně vážou komponenty regulačních mechanismů, například proteiny Shelterin komplexu (viz. Obr. 4). Shelterin komplex má kromě úlohy v ochraně konců chromozomů také regulační účinky na telomerázovou aktivitu. Proteiny TRF1 a TRF2 svými vazebnými SANT/Myb doménami vážou telomeru v dvouvláknové oblasti, zároveň však oba zastávají další odlišné funkce. TRF1 je zásadní pro hladký posun replikační vidlice po vláknech, zabraňuje aktivaci ATR, brání tvorbě křehkých chromozomů v metafázi a podporuje telomerázovou aktivitu náborem helikáz BLM a RTEL (Sfeir et al., 2009). TRF2 hraje důležitou roli ve vazbě a aktivaci nukleázy Apollo, která udržuje G-převisy a inhibuje ATM signalizaci v S fázi (Wu et al., 2010). Absence TRF vede k nekontrolovatelným fúzím konců chromozomů prostřednictvím NHEJ a ke ztrátě G-převisu. Vazebné proteiny TIN2 a TPP1 zajišťují spojení mezi proteinem POT1 interagujícím s jednovláknovým 3'převísem telomery a s již zmiňovanými proteiny TRF1 a TRF2. Proteiny POT1 a TPP1 společně tvoří komplex, který mimo jiné funguje jako faktor procesivity telomerázy při prodloužování telomer. Po dosyntetizování repetitivní sekvence telomery na určitou hranici se tento komplex naváže na 3' konec prodlouženého vlákna a

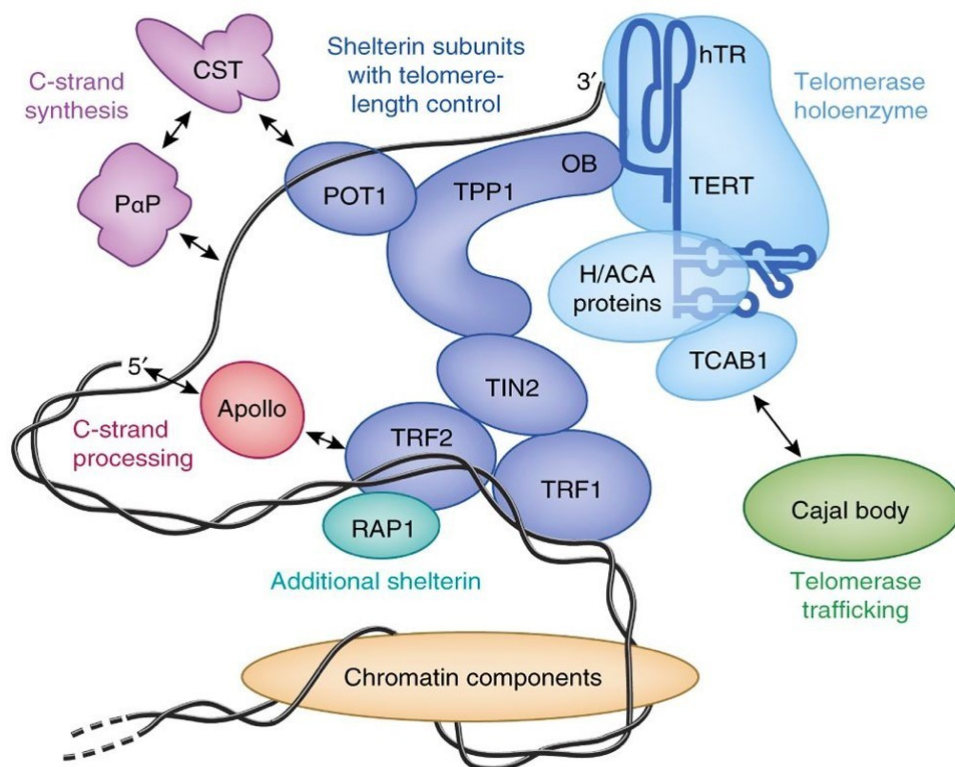
zabrání tak telomeráze v dalším prodlužování (Wang et al., 2007). Posledním proteinem Shelterin komplexu je Rap1. Interaguje s TRF2 a zabráňují společně fúzí nehomologních rekombinantních úseků (NHEJ) a konců chromozomů (Sarthý et al., 2009).

Mimo hlavní proteiny Shelterin komplexu se na regulaci telomerázové aktivity podílejí i přídavné Shelterin komponenty. Například velmi důležitým členem zajišťujícím translokaci telomerázy k telomerám je TCAB1 faktor. Stabilně asociuje s aktivní telomerázou a směřuje ji přes Cajalova tělíska k telomerám (Venteicher et al., 2009). Jedna ze tří domén lidské TER má motiv dvouvláknové vlásenky H/ACA, sestavuje se se čtyřmi evolučně velmi konzervovanými proteiny (Dyskerin, GAR1, NHP2, NOP10) a tvoří H/ACA RNP. H/ACA motiv je sdílen s velkou rodinou malých nukleárních H/ACA RNA (snoRNA) a malých Cajal RNA (scaRNA) (Nguyen et al., 2019). Rodina snoRNA má funkci v jádře, kde vede štěpení a modifikace ribozomální RNA a scaRNA zase fungují v Cajalových tělískách, kde vedou modifikace snRNA (Darzacq et al., 2002). Dalším faktorem podílejícím se na regulaci telomerázového mechanismu je proteinový komplex CST. Působí jako stimulátor DNA polymerázové α -primázové aktivity (P α P), prodlužující C-vláknem telomery. Shelterin protein POT1 zprostředkovává interakci CST komplexu s G-vláknem, aby zabránil telomeráze v jeho syntéze. Společně s P α P se následně podílejí na syntéze C-vláknem telomery (Chen et al., 2012). Posledním významným komponentem je Apollo exonukleáza směru 3'-5' vázaná na protein TRF2. Je zodpovědná za resekci vedoucího vlákna po replikaci, vedoucí k vytvoření jednovláknového 3' převisu (Wu et al., 2010).

Části proteinového komplexu Shelterin se k DNA dostávají přes interakci s proteiny TRF1 a TRF2, které se vážou na DNA přímo v oblasti dvouřetězcových repetit. DNA vazebný protein POT1 zajistí přemostění TRF1 a TRF2, přes další molekuly Shelterin komplexu (TIN2 a TPP1), k jednovláknovému 3' převisu. Shelterin protein RAP1 neinteraguje přímo s DNA, ale váže se na TRF2, který je na dvouřetězcové struktuře navázaný. Dalšími komponenty regulujícími prodlužování konců chromozomu a biogenezi telomerázy jsou proteiny H/ACA (dyskerin, NHP2, NOP10 a GAR1). Interagují s ribozomální podjednotkou telomerázového holoenzymu hTR, konkrétně s jejími nepřekrývajícími se oblastmi u konců vlásenky.

Cajalovo tělísko zde hraje roli v RNA metabolických procesech a v translokaci telomerázy k telomerám. Po interakci s TCAB1 faktorem pomáhá s recyklací, maturací a biogenezi snRNP, zpracovává histonovou mRNA a podílí se i na udržování telomer. Komplex proteinů CST (CTC1, STN1 a TEN1) se společně s DNA polymerázou alfa (Pol α) se společně podílejí na syntéze a stabilizaci C-vláknem. Posledním komponentem asociovaným s Shelterin komplexem je nukleáza

Apollo z rodiny SNM1/Pso2 nukleáz, která mimo jiné chrání zakončení chromozomů před opravnými mechanismy (viz. Obr. 4)



Obr. 4: Shelterin komplex

Schéma Shelterin komplexu regulujícího enzym telomerázou při procesu prodlužování telomer (převzato a upraveno z Hockemeyer and Collins, 2015).

Přítomnost telomerázy v buňce není vůbec obvyklým jevem. V buňkách lidských tkání běžně nedochází k prodlužování telomer telomerázou, a proto se buňky s každým dělením přibližují k dosažení Hayflickova limitu. S tím jde ruku v ruce senescentní fáze nebo apoptóza, což je náhodný neprogramovaný zánik buňky. Může však nastat situace, kdy dojde ve stárnoucí buňce prostřednictvím genetických abnormalit či jiných činitelů k mutacím, které mohou aktivovat enzym telomerázu. Tím se tato defektní buňka stane nesmrtelnou, nekonečně se dělicí a velmi nebezpečnou. Je to jedna z mnoha cest vzniku nádorového bujení.

3.6 Alternativní prodlužování telomer

Některé typy buněk (zejména nádorové) jsou schopny prodlužovat telomery zcela nezávisle na přítomnosti enzymu telomerázy. Proces alternativního prodlužování telomer (ALT) byl poprvé objeven u mutantních kvasinek bez telomerázy. Zjistilo se, že mechanismus procesu telomerového prodlužování je závislý na genu RAD52, který kóduje homologní rekombinantní protein (Lundblad and Blackburn, 1993). Brzy poté se objevily výzkumy poukazující na prodlužování telomer v lidských

buňkách, ve kterých nebyla aktivní telomeráza (Bryan et al., 1995) a další výzkumy, které tento jev v lidských buňkách přisuzovaly mechanismu homologní rekombinace (Murnane et al., 1994).

ALT mechanismus prodlužuje telomery jejich výměnou mezi sesterskými chromatidami (T-SCE) (*Cesare and Reddel, 2010). Zajímavostí je, že si buňky volí ALT způsob prodlužování místo prostého zachování telomerázové aktivity. Při ALT dochází k rozsáhlým homologním rekombinacím, které mohou ovlivňovat stabilitu genomu.

Kolem ALT je stále mnoho otazníků. Některé teorie předpokládají kooperaci ALT s TERRA molekulami (Azzalin et al., 2007), jiné navrhuji, že mechanismy podobné ALT se vyskytují v zárodečných buňkách. Ty, ačkoliv nemají aktivní telomerázu, prodlužují své telomery během procesů dozrávání (Stindl, 2016)

4 Telomery v gametách

Doposud byla senescence a zkracování telomer zmiňována pouze v souvislosti s degenerativními změnami, patologickými stavy a stárnutím organismu. Tyto procesy jsou ale nepostradatelné při dalších dějích jako je vznik a vývoj nového organismu.

U savců procesy ovlivňující konce telomer nepostihují pouze klasické somatické buňky, ale mají také rozhodující vliv na kvalitu savčích gamet.

4.1 Stárnutí a telomery oocytů

Je všeobecně známým faktem a fyziologickým procesem, že s věkem ženy klesá její schopnost otěhotnět a donosit zdravé dítě. Vzhledem k současnému trendu oddalování prvního těhotenství a také k mnoha dalším okolním vlivům, dochází k narůstání procenta neplodných žen a tím i případů asistované reprodukce.

K poklesu fertility začíná pozvolna docházet kolem 35. roku života ženy (odlišnosti v závislosti na genetických faktorech či životních podmínkách). Obvykle je to proces pomalý, završený nástupem menopauzy, kdy žena úplně ztrácí schopnost otěhotnět. Stárnutí oocytů by se v porovnání se zbytkem těla dalo považovat za předčasné, protože nastupuje mnohem dříve než u ostatních buněk. Snížená fertilita není jediným důsledkem rychle stárnoucích oocytů. Ve větší míře jsou zde také zastoupeny samovolné potraty, dochází k nondisjunkcím chromozomů a v karyotypech oocytů se častěji objevují

genetické abnormality (Keefe et al., 2006). Prokazatelně je ve větší míře zastoupen výskyt aneuploidií při preimplantační genetické diagnostice starších žen (Munné et al., 1999).

Negativní vliv zkrácených telomer v oocytech byl dokázán v rámci experimentů prováděných na myších. Za normálních okolností eroze myší telomery nepostihuje a neprojevuje se u nich fenotyp reprodukčního stárnutí tak, jak je tomu u lidí. Se zkrácením telomer došlo u myší k napodobení jevů, které jsou pozorovány u fenotypu stárnoucích lidských oocytů. Embrya se přestávala dělit, zvyšovala se pravděpodobnost výskytu chromozomových abnormalit a docházelo k fragmentaci. (Liu et al., 2002a, 2004).

Senescentní procesy probíhající u savčích oocytů v důsledku věku, nejsou stále úplně popsány ani pochopeny. Jedna z nejpravděpodobnějších teorií však naznačuje, že jsou to následky progresivního zkracování telomer. Telomery chromozomů se u lidských oocytů začínají zkracovat již během fetální oogeneze. Nereplikují se tedy přímo oocyty, ale jejich prekurzory (Keefe et al., 2006). Vaječníky dospělých žen neobsahují oogonie, dívky se již rodí s „plnou výbavou“ oocytů, které pouze postupně dozrávají a ovulují (Liu et al., 2007). Bylo zjištěno, že oocyty, které jako poslední odchází z prenatálních oogoniálních cyklů, jsou později v dospělosti posledními, které ovulují (Henderson and Edwards, 1968; Polani and Crolla, 1991). Toto zjištění vede k závěru, že v pozdějších fázích života ženy ovulují oocyty, které už měly kratší telomery při svém vzniku (*Keefe, 2020). Největší podíl na zkracování telomer oocytů v průběhu života pak mají ROS, ke kterým jsou vlákna DNA a zejména telomery velmi citlivé. Telomery jsou totiž bohaté na guanin, který je ze všech nukleotidů nejvíce náchylný na oxidaci (Liu et al., 2002b).

Délka telomer je nejspíše i biomarkerem kvality embryí. Dlouhé telomery granulózních buněk se vyskytují častěji u embryí kvalitních a zdravých, zatímco kratší telomery bývají spojovány s patofyziologickými stavy embryí (Cheng et al., 2013).

4.2 Telomery spermií

Na rozdíl od diferenciací oocytů u žen, která nastává pouze během fetálního období, spermatogeneze ve varlatech probíhá po celý dospělý život muže. Jednotlivé haploidní spermie jsou posledním stadiem vícestupňového procesu spermatogeneze. Telomery spermií jsou ukotvené k jaderné membráně, kde mají zásadní roli při organizaci jádra (Moskovtsev et al., 2010). Nedávné výzkumy ukázaly, že homeostáza telomer spermií úzce souvisí s plodností mužů. U pacientů s idiopatickou neplodností byly přítomny spermie s porušenou homeostázou a strukturou telomer (Reig-Viader et al., 2014). Celkově může kritické zkrácení telomery způsobit chyby při segregaci chromatid, apoptózu či pokles tvorby jednotlivých zdravých spermií (Ioannou and Griffin, 2011)

Unikátní vlastností spermatických telomer je, že se s věkem organismu naopak prodlužují (Kimura et al., 2008). Jak již bylo zmíněno, telomery většiny buněk s každým dělením ztrácí kousek své repetitivní sekvence a tím pádem se zkracují. Pluripotentní kmenové buňky si se zkracováním umí poradit díky enzymu telomeráze. Nedochází však k prodlužování konce chromozomu, ale spíše vyrovnávání ztráty. Tak výrazné prodlužování, jaké je popsáno u telomer spermií, je neobvyklé nejen u buněk lidského těla, ale i u somatických buněk ostatních savců.

Existují hned dvě teorie, které popisují mechanismus prodlužování telomer spermií. Jedna předkládá elongaci způsobenou enzymem telomerázou a druhá, která je v současné době považována za pravděpodobnější, je alternativní prodlužování procesy homologní rekombinace (ALT). Nejpodstatnějším rozdílem mezi těmito dvěma mechanismy je nejspíš způsob, jakým se sekvence na telomery přidávají. Telomeráza postupuje od nejkratších telomer, čímž značně snižuje heterogenitu délek telomer v genomu. Naopak ALT mechanismy se heterogenita délek telomer prudce zvyšuje. U starších mužů se heterogenita telomer značně zvyšovala, a proto se předpokládá, že se na prodlužování podílí více procesů než jen enzym telomeráza (Antunes et al., 2015; Baird et al., 2005).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout nejdůležitější milníky v historii výzkumu buněčného stárnutí, představit základní charakteristiky a poznatky o buněčném stárnutí na molekulární úrovni, objasnit pojmy Telomerová teorie a Hayflickův limit, vysvětlit mechanismus replikativního zkracování telomer a nastínit senescenci zárodečných buněk.

Když nebereme v úvahu úplně první zmínky o buněčném stárnutí ze začátku 20. století, patří prvenství v oblasti výzkumu senescence prof. Leonardu Hayflickovi. Položil pomyslné základy tomuto odvětví, na kterých se dodnes staví a bez kterých bychom nebyli schopni porozumět buněčné senescenci v takovém rozsahu, jaký známe dnes. S teorií zkracujících se telomer ho nezávisle na sobě následovali dva vědci z opačných konců světa James Watson a Alexey Olovnikov. Pojem telomera je datován už do první poloviny 20. století a stojí za ním americký genetik Hermann J. Muller. Velký podíl na pochopení procesů odehrávajících se kolem telomer má cytogenetička Barbara McClintock, která se zaměřovala hlavně na ochranné mechanismy konců chromozomů. S téměř úplným popisem molekulární podstaty koncových oblastí chromozomů přišla laboratoř bioložky Elizabeth Blackburn. Tomuto vědeckému týmu náleží i zásluha za objevení enzymu telomerázy. Vědců, kteří se na poznávání buněčného stárnutí podíleli a stále podílejí, je samozřejmě mnohem více.

Buněčná senescence je složitý proces sestávající z řady komponentů a jejich drah. Po zastavení buněčného cyklu buňka nadále žije, nicméně její původní funkce často zaniká, nebo je různých směrech pozměněna. Senescentní buňka se od své klasické zdravé podoby liší řadou věcí. Znaky a projevy buněk v senescentní fázi však nejsou vždy jednotné a každý buněčný typ se může prezentovat jinak. Obvykle se u senescentních buněk setkáváme se změnou velikosti a tvaru, komplexem sekrečních drah SASP, modifikacemi heterochromatinu SAHF, výskytem fosforylovaných histonů γ -H2AX a také se zvýšenou hladinou lysozomální β -galaktosidázy SA- β -gal. Senescentní stav nastává nejčastěji v reakci na poškození DNA, nebo po dosažení replikačního maxima, takzvaného Hayflickova limitu. Senescence je velmi stabilní a téměř nezvratný stav, který může být účinnou prevencí nebo rizikovým faktorem vzniku řady onemocnění.

S rozvojem vědeckých technik umožňujících zkoumání genetické informace na molekulární úrovni, se přišlo na to, že chromozomy nemají konzistentní strukturu po celé své délce. Konkrétně jejich konce, které dostaly název telomery, se skládají z tandemově se opakujících repetitivních sekvencí nukleotidů. Slouží především k ochraně kódující DNA, která se nachází hned za oblastmi telomer. S každou replikací se tyto sekvence o kus zkrátí a jsou blíž k dosažení tzv. Hayflickova limitu. Přesný počet možných replikačních událostí jednotlivých buněk se jen těžko odhaduje, nicméně většinou se

pohybuje kolem 50-70 dělení za život buňky. Jestliže v buňce nejsou přítomny mechanismy, které by ztracené sekvence doplnily (aktivní enzym telomeráza, mechanismus ALT), ocitá se buňka v senescentní fázi, ze které již není úniku. Stane se tak v rámci preventivních opatření, aby nedošlo ke ztrátě kódující sekvence při další replikační události.

S pochopením mechanismů vyrovnávajících ztrátu telomerických sekvencí, se objevily hypotézy pojednávající o telomeráze jako o prostředku k dosažení nesmrtelnosti. Běžné somatické buňky většinou aktivní telomerázu nemají, objevuje se ve větší míře pouze u embryonálních kmenových buněk a hlavně pak v buňkách nádorových. Postupem času se ukázalo, že u jedinců, kteří mají detekovatelnou aktivní telomerázu v normálních buňkách, je vyšší riziko vzniku nádorového bujení. Z dosažení věčného života využitím telomerázy tedy sešlo a nejspíš bude třeba vynaložit ještě hodně úsilí, abychom se k němu alespoň o kousek přiblížili.

Mohlo by se zdát, že proces stárnutí je vcelku jednoduchou záležitostí. Vzhledem ke všem faktorům a okolnostem, které mohou stav buňky ovlivňovat, je tohle celé pouze zjednodušený model, který poskytuje alespoň představu o tom, co se s buňkou v čase děje. V kombinaci s obrovským množstvím buněčných typů máme tedy nespočet možných scénářů, které mohou nastat.

Seznam literatury

- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al., 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* 15, 978–990.
- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al., 2008. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* 133, 1006–1018.
- Amundson, S.A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, A.J., 2001. Induction of Gene Expression as a Monitor of Exposure to Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* 156, 657–661.
- Antunes, D.M.F., Kalmbach, K.H., Wang, F., Dracxler, R.C., Seth-Smith, M.L., Kramer, Y., Buldo-Licciardi, J., Kohlrausch, F.B., Keefe, D.L., 2015. A single-cell assay for telomere DNA content shows increasing telomere length heterogeneity, as well as increasing mean telomere length in human spermatozoa with advancing age. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 1685–1690.
- Armanios, M.Y., Chen, J.J.-L., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R.G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J.A., et al., 2007. Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 1317–1326.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., Lingner, J., 2007. Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* 318, 798–801.
- Bailey, S.M., Meyne, J., Chen, D.J., Kurimasa, A., Li, G.C., Lehnert, B.E., Goodwin, E.H., 1999. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14899–14904.
- Baird, D.M., Britt-Compton, B., Rowson, J., Amso, N.N., Gregory, L., Kipling, D., 2005. Telomere instability in the male germline. *Hum. Mol. Genet.* 15, 45–51.
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506.
- Balakin, A.G., Smith, L., Fournier, M.J., 1996. The RNA World of the Nucleolus: Two Major Families of Small RNAs Defined by Different Box Elements with Related Functions. *Cell* 86, 823–834.
- Baumann, P., Cech, T.R., 2001. Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans. *Science* 292, 1171–1175.
- Benn, P.A., 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am. J. Hum. Genet.* 28, 465–473.
- Bhaumik, D., Scott, G.K., Schokrpur, S., Patil, C.K., Orjalo, A.V., Rodier, F., Lithgow, G.J., Campisi, J., 2009. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging* 1, 402–411.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., de Lange, T., 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16, 1785–1794.
- *Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G., Sikora, E., 2018. Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mech. Ageing Dev.* 170, 13–21.
- Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T., Gilson, E., 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* 17, 236–239.
- Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., Krizhanovsky, V., 2017. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* 16, 661–671.
- Blackburn, E.H., Gall, J.G., 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120, 33–53.
- Boder, E., Sedgwick, R.P., 1958. Ataxia-Telangiectasia. *Pediatrics* 21, 526.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al., 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494, 361–365.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T., 1997. Human telomeres contain two

- distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17, 231–235.
- Broccoli, D., Young, J.W., de Lange, T., 1995. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9082–9086.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al., 2004. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science* 303, 2011–2015.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., Reddel, R.R., 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14, 4240–4248.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J.C., Cimprich, K.A., 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040–1052.
- Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer, A.J., Bolger, P.M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M.G., Chiueh, C.C., Clarkson, T.W., et al., 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 122–128.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., Calabrese, E.J., 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Oxidative Damage Dis.* 32, 279–304.
- *Campisi, J., d’Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.
- Carrel, A., Ebeling, A.H., 1921. Age and multiplication of fibroblasts. *J. Exp. Med.* 34, 599–623.
- *Cesare, A.J., Reddel, R.R., 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* 11, 319–330.
- Chai, W., Ford, L.P., Lenertz, L., Wright, W.E., Shay, J.W., 2002. Human Ku70/80 Associates Physically with Telomerase through Interaction with hTERT. *J. Biol. Chem.* 277, 47242–47247.
- Chapman, J.R., Sossick, A.J., Boulton, S.J., Jackson, S.P., 2012. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J. Cell Sci.* 125, 3529–3534.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., Halazonetis, T.D., 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14, 278–288.
- Chen, L.-Y., Redon, S., Lingner, J., 2012. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* 488, 540–544.
- *Chen, Y., Sanchez, Y., 2004. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *Bridge broken ends - Cell. Response DNA Breaks Health Dis.* 3, 1025–1032.
- Cheng, E.-H., Chen, S.-U., Lee, T.-H., Pai, Y.-P., Huang, L.-S., Huang, C.-C., Lee, M.-S., 2013. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality†. *Hum. Reprod.* 28, 929–936.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., de Lange, T., 1995. A Human Telomeric Protein. *Science* 270, 1663–1667.
- Cimprich, K.A., 2003. Fragile Sites: Breaking up over a Slowdown. *Curr. Biol.* 13, R231–R233.
- *Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., Campisi, J., 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 99–118.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., Campisi, J., 2008. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biol.* 6, 2853–2868.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M., Gautier, J., 2003. An ATR- and Cdc7-Dependent DNA Damage Checkpoint that Inhibits Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell* 11, 203–213.
- Darzacq, X., Jány, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E., Kiss, T., 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J.* 21, 2746–2756.
- *de Laat, W.L., Jaspers, N.G.J., Hoeijmakers, J.H.J., 1999. Molecular mechanism of nucleotide

- excision repair. *Genes Dev.* 13, 768–785.
- de Magalhães, J.P., Curado, J., Church, G.M., 2009. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 25, 875–881.
- Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Karnitz, L.M., 2007. The Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev.* 21, 1472–1477.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.
- Egan, E.D., Collins, K., 2010. Specificity and Stoichiometry of Subunit Interactions in the Human Telomerase Holoenzyme Assembled In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2775–2786.
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., Cawthon, R.M., 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17312–17315.
- Falck, J., Coates, J., Jackson, S.P., 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611.
- *Featherstone, C., Jackson, S.P., 1999. DNA double-strand break repair. *Curr. Biol.* 9, R759–R761.
- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M., Smythe, C., 2001. Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J. Cell Biol.* 154, 913–924.
- Feng, J., Funk, W., Wang, S., Weinrich, S., Avilion, A., Chiu, C., Adams, R., Chang, E., Allsopp, R., Yu, J., et al., 1995. The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236–1241.
- Fontana, L., Klein, S., Holloszy, J.O., 2010. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *AGE* 32, 97–108.
- *Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.-Y., Campisi, J., 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* 16, 238–246.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.-Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., et al., 2003. Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 20303–20312.
- Gary, R.K., Kindell, S.M., 2005. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.* 343, 329–334.
- Goldbach, R.W., Bollen-de Boer, J.E., Van Bruggen, E.F.J., Borst, P., 1979. Replication of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.* 562, 400–417.
- Gotoff, S.P., Amirmokri, E., Liebner, E.J., 1967. Ataxia Telangiectasia: Neoplasia, Untoward Response to X-Irradiation, and Tuberous Sclerosis. *Am. J. Dis. Child.* 114, 617–625.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331–337.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1987. The telomere terminal transferase of *tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887–898.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., de Lange, T., 1999. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 97, 503–514.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- Harman, D., 1965. The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels. *J. Gerontol.* 20, 151–153.
- Hayflick, L., 1979. Progress in cytogerontology. *Mech. Ageing Dev.* 9, 393–408.
- Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–

- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Heitman, J., Movva, N., Hall, M., 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–908.
- Hekimi, S., Lapointe, J., Wen, Y., 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–576.
- Henderson, S.A., Edwards, R.G., 1968. Chiasma Frequency and Maternal Age in Mammals. *Nature* 218, 22–28.
- Hockemeyer, D., Collins, K., 2015. Control of telomerase action at human telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 848–852.
- Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., et al., 1999. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13, 817–826.
- Ioannou, D., Griffin, D.K., 2011. Male Fertility, Chromosome Abnormalities, and Nuclear Organization. *Cytogenet. Genome Res.* 133, 269–279.
- Issa, J., 2000. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 249, 101–118.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., Jackson, S.P., 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 37–45.
- Jelinsky, S.A., Estep, P., Church, G.M., Samson, L.D., 2000. Regulatory Networks Revealed by Transcriptional Profiling of Damaged *Saccharomyces cerevisiae* Cells: Rpn4 Links Base Excision Repair with Proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8157–8167.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., de Lange, T., 1999. p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2. *Science* 283, 1321–1325.
- *Keefe, D.L., 2020. Telomeres and genomic instability during early development. *Eur. J. Med. Genet.* 63, 103638–103641.
- Keefe, D.L., Marquard, K., Liu, L., 2006. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18., 280–285.
- Kennedy, A.L., McBryan, T., Enders, G.H., Johnson, F.B., Zhang, R., Adams, P.D., 2010. Senescent mouse cells fail to overtly regulate the HIRA histone chaperone and do not form robust Senescence Associated Heterochromatin Foci. *Cell Div.* 5, 16–16.
- Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S., Shay, J., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Kim, S., Kaminker, P., Campisi, J., 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 23, 405–412.
- Kimura, M., Cherkas, L.F., Kato, B.S., Demissie, S., Hjelmberg, J.B., Brimacombe, M., Cupples, A., Hunkin, J.L., Gardner, J.P., Lu, X., et al., 2008. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS genetics* 4(2),
- *Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2011. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Longev. Consort.* 10, 205–215.
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., Bartek, J., 2011. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle* 10, 457–468.
- Krishnan, V., Chow, M.Z.Y., Wang, Z., Zhang, L., Liu, B., Liu, X., Zhou, Z., 2011. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in *Zmpste24*-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12325–12330.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., Peeper, D.S., 2008. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* 133, 1019–1031.
- Kuranda, K., Vargaftig, J., de la Rochere, P., Dosquet, C., Charron, D., Bardin, F., Tonnelle, C., Bonnet, D., Goodhardt, M., 2011. Age-related changes in human hematopoietic

- stem/progenitor cells. *Aging Cell* 10, 542–546.
- Lam, Y.C., Akhter, S., Gu, P., Ye, J., Poulet, A., Giraud-Panis, M.-J., Bailey, S.M., Gilson, E., Legerski, R.J., Chang, S., 2010. SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. *EMBO J.* 29, 2230–2241.
- *Laron, Z., 2001. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol. Pathol.* MP 54, 311–316.
- *Lavin, M.F., Shiloh, Y., 1997. The genetic defect in Ataxia-Telangiectasia. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 177–202.
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, Passos, J.F., 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Biomark. Ageing Mol. Biol. Clin. Perspect.* 45, 772–778.
- Lee, J.-H., Paull, T.T., 2005. ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308, 551–554.
- Lejnine, S., Makarov, V.L., Langmore, J.P., 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2393–2397.
- Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B., 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951–960.
- Li, B., Oestreich, S., de Lange, T., 2000. Identification of Human Rap1: Implications for Telomere Evolution. *Cell* 101, 471–483.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R., 1997. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* 276, 561–567.
- Liu, L., Blasco, M.A., Keefe, D.L., 2002a. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep.* 3, 230–234.
- Liu, L., Franco, S., Spyropoulos, B., Moens, P.B., Blasco, M.A., Keefe, D.L., 2004. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6496–6501.
- Liu, L., Trimarchi, J.R., Smith, P.J.S., Keefe, D.L., 2002b. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell* 1, 40–46.
- Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, Dongzi., Albertini, D.F., Keefe, D.L., Liu, L., 2007. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev. Biol.* 306, 112–120.
- *Lowndes, N.F., Murguia, J.R., 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 17–25.
- Lundblad, V., Blackburn, E.H., 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1– senescence. *Cell* 73, 347–360.
- *Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., Oda, M., 2010. Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* 79, 89–130.
- B., 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., Peeper, D.S., 2005. BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.
- Mitchell, J.R., Wood, E., Collins, K., 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551–555.
- Morin, G.B., 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521–529.
- Morin, G.B., Cech, T.R., 1988. Mitochondrial telomeres: Surprising diversity of repeated telomeric DNA sequences among six species of *Tetrahymena*. *Cell* 52, 367–374.
- Moskovtsev, S.I., Willis, J., White, J., Mullen, J.B.M., 2010. Disruption of Telomere–Telomere Interactions Associated with DNA Damage in Human Spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56, 407–412.
- Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., Guarente, L., 2004. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell* 116, 551–563.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at

- the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6622.
- Muller, H., 1938. The remaking of chromosomes. *Collect. Net* 13, 181–198.
- Munné, S., Magli, C., Cohen, J., Morton, P., Sadowy, S., Gianaroli, L., Tucker, M., Márquez, C., Sable, D., Ferraretti, A.P., et al., 1999. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum. Reprod.* 14, 2191–2199.
- Munro, J., Barr, N.I., Ireland, H., Morrison, V., Parkinson, E.K., 2004. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* 295, 525–538.
- Murnane, J.P., Sabatier, L., Marder, B.A., Morgan, W.F., 1994. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J.* 13, 4953–4962.
- Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., Cech, T.R., 2012. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* 492, 285–289.
- *Narita, M., 2007. Cellular senescence and chromatin organisation. *Br. J. Cancer* 96, 686–691.
- Narita, Masashi, Nuñez, S., Heard, E., Narita, Masako, Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., Lowe, S.W., 2003. Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113, 703–716.
- Nguyen, T.H.D., Collins, K., Nogales, E., 2019. Telomerase structures and regulation: shedding light on the chromosome end. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 55, 185–193.
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, et al., 2007. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686–690.
- Ogryzko, V., Hirai, T., Russanova, V., Barbie, D., Howard, B., 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5210–5218.
- Olovnikov, A.M., 1996. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Exp. Gerontol.* 31, 443–448.
- Olovnikov, A.M., 1973. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.
- Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., Campisi, J., 2009. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17031–17036.
- Packer, L., Fuehr, K., 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423–425.
- Pati, S., Jain, S., Behera, M., Acharya, A.P., Panda, S.K., Senapati, S., 2014. X-gal staining of canine skin tissues: A technique with multiple possible applications. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 5, 245–249.
- Pawlikowska, L., Hu, D., Huntsman, S., Sung, A., Chu, C., Chen, J., Joyner, A.H., Schork, N.J., Hsueh, W.-C., Reiner, A.P., et al., for the Study of Osteoporotic Fractures, 2009. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell* 8, 460–472.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., et al., 2010. Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice. *Science* 328, 753.
- Peng, C.-Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnicka-Worms, H., 1997. Mitotic and G₂ Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science* 277, 1501.
- *Podlevsky, J.D., Chen, J.J.-L., 2016. Evolutionary perspectives of telomerase RNA structure and function. *RNA Biol.* 13, 720–732.
- *Podlevsky, J.D., Chen, J.J.-L., 2012. It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 730, 3–11.
- Polani, P.E., Crolla, J.A., 1991. A test of the production line hypothesis of mammalian oogenesis. *Hum. Genet.* 88, 64–70.

- *Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., Bonner, W., 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162–169.
- Reig-Viader, R., Capilla, L., Vila-Cejudo, M., Garcia, F., Anguita, B., Garcia-Caldés, M., Ruiz-Herrera, A., 2014. Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil. Steril.* 102, 728–738.
- Rinderknecht, E., Humbel, R.E., 1976. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2365–2369.
- Robles, S.J., Adami, G.R., 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–1123.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., Campisi, J., 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 973–979.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., Weissman, I.L., 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725–729.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., Weissman, I.L., 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9194–9199.
- Sarthy, J., Bae, N.S., Scraftford, J., Baumann, P., 2009. Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J.* 28, 3390–3399.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., Lowe, S.W., 2002. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell* 109, 335–346.
- Schoeftner, S., Blasco, M.A., 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 10, 228–236.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W., 1997. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Sesto, A., Navarro, M., Burslem, F., Jorcano, J.L., 2002. Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2965–2970.
- Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A., Cristofalo, V.J., 2000. Is β -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp. Cell Res.* 257, 162–171.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., de Lange, T., 2009. Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell* 138, 90–103.
- *Shay, J.W., Wright, W.E., 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10771–10778.
- *Sikora, E., Bielak-Żmijewska, A., Mosieniak, G., 2018. What is and what is not cell senescence. *Postepy Biochem.* 64, 110–118.
- Singh, F., Charles, A.-L., Schlagowski, A.-I., Bouitbir, J., Bonifacio, A., Piquard, F., Krähenbühl, S., Geny, B., Zoll, J., 2015. Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 1574–1585.
- Slagboom, P.E., Droog, S., Boomsma, D.I., 1994. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 876–882.
- Smith, S., Giriat, L., Schmitt, A., de Lange, T., 1998. Tankyrase, a Poly(ADP-Ribose) Polymerase at Human Telomeres. *Science* 282, 1484–1487.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rønnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B.,

- Bartek, J., Lukas, J., 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., Jeggo, P.A., 2004. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res.* 64, 2390–2396.
- Stindl, R., 2016. The paradox of longer sperm telomeres in older men's testes: a birth-cohort effect caused by transgenerational telomere erosion in the female germline. *Mol. Cytogenet.* 9, 12.
- Sun, D., Lopez-Guajardo, C.C., Quada, J., Hurley, L.H., Von Hoff, D.D., 1999. Regulation of Catalytic Activity and Processivity of Human Telomerase. *Biochemistry* 38, 4037–4044.
- Swim, H.E., Parker, R.F., 1957. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially. *Am. J. Epidemiol.* 66, 235–243.
- Swindell, W.R., 2009. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. *BMC Genomics* 10, 585.
- Syllaba K, Henner K, 1926. Contribution a l'indépendance de l'athetose double idiopathique et congenitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev Neurol* 1, 541–562.
- Szillard, L., 1959. On the nature of the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45,
- Szostak, J.W., Blackburn, E.H., 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29, 245–255.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., Baltimore, D., 2006. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12481–12486.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17, 5497–5508.
- Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H.E.D., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I., Heijmans, B.T., 2012. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694–703.
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., et al., 2012. Decreased Proteasomal Activity Causes Age-Related Phenotypes and Promotes the Development of Metabolic Abnormalities. *Am. J. Pathol.* 180, 963–972.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al., 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- van Steensel, B., de Lange, T., 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740–743.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., de Lange, T., 1998. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* 92, 401–413.
- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., Artandi, S.E., 2009. A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis. *Science* 323, 644–648.
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G.C., Bielas, J.H., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., Loeb, L.A., 2008. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat. Genet.* 40, 392–394.
- Walford, R.L., Mock, D., Verdery, R., MacCallum, T., 2002. Calorie Restriction in Biosphere 2: Alterations in Physiologic, Hematologic, Hormonal, and Biochemical Parameters in Humans Restricted for a 2-Year Period. *J. Gerontol. Ser. A* 57, B211–B224.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaig, A.J., Yang, Y., Baci, P., Cech, T.R., Lei, M., 2007. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506–510.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Harris, C.C., 1999. GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint.

- Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 3706–3711 .
- Watson, J.D., 1972. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature. New Biol.* 239, 197–201.
- Weismann, A., 1892. Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. G. Fischer.
- West, M.H.P., Bonner, W.M., 1980. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19, 3238–3245.
- Wright, W., Piatyszek, M., Rainey, W., Byrd, W., Shay, J., 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18, 173–9.
- Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., de Lange, T., 2010. Apollo Contributes to G Overhang Maintenance and Protects Leading-End Telomeres. *Mol. Cell* 39, 606–617.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660.
- Yakes, F.M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 514–519.
- Zhang, R., Chen, W., Adams, P., 2007. Molecular Dissection of Formation of Senescent Associated Heterochromatin Foci. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2343–58.
- Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al., 2005. Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19–30.
- Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., de Lange, T., 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 12(11), 4834–4843.
- Zhou, X.Z., Lu, K.P., 2001. The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1 Is a Potent Telomerase Inhibitor. *Cell* 107, 347–359.
- Zou, L., Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300, 1542–1548

*Hvězdičkou jsou v textu a v seznamu literatury označeny sekundární zdroje (review).